

**ZUR STRUKTUR DER FETTSÄURESYNTHETASE
AUS HEFE**

**Reversible Dissoziation des Multienzymkomplexes
und präparative Isolierung seiner Untereinheiten**

Felix Wieland

1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ZUR STRUKTUR DER FETTSÄURESYNTHETASE AUS HEFE

Reversible Dissoziation des Multienzymkomplexes
und präparative Isolierung seiner Untereinheiten

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München



vorgelegt von
Felix Wieland

München 1978

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Hartmann
2. Berichterstatter: Professor Dr. E.-L. Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 3.3.1978



Das vorliegende Dokument wurde am 1. März 1978 im Rahmen
des 100. Geburtstages des Reiches der Niederlande
in Amsterdam, den 1. März 1978, zwischen der Regierung
der Niederlande und der Regierung der Bundesrepublik
Deutschland abgeschlossen.

Beide Regierungen sind sich bewusst, dass die Beziehungen
zwischen den beiden Ländern seit langem eine wichtige
Rolle spielen.

Die beiden Regierungen sind sich bewusst, dass die Beziehungen
zwischen den beiden Ländern seit langem eine wichtige
Rolle spielen.

Für OTTI

Die beiden Regierungen sind sich bewusst, dass die Beziehungen
zwischen den beiden Ländern seit langem eine wichtige
Rolle spielen.

Die beiden Regierungen sind sich bewusst, dass die Beziehungen
zwischen den beiden Ländern seit langem eine wichtige
Rolle spielen.

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1974 bis Oktober 1977 auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. Feodor Lynen am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München und am Biochemischen Institut der Universität München ausgeführt.

Herrn Professor Dr. Feodor Lynen danke ich herzlich für das Interesse, das er mir und meiner Arbeit jederzeit zuteil werden ließ.

Für ihre zuverlässige und intelligente Mitarbeit ab August 1975 danke ich Frau Leni Renner. Fräulein Cornelia Verfürth danke ich für ihre ebenfalls ausgezeichnete Unterstützung seit März 1977.

Ferner möchte ich mich bei vielen Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts für Biochemie und des Biochemischen Instituts der Universität München für kritische Diskussionen und für ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Herrn Hans Engeser und Herrn Dr. Elmar Siess gilt mein Dank für die anregende Zusammenarbeit.

GLIEDERUNG

	Seite
Einleitung	1
Ergebnisse	8
Vorbemerkung	8
I Spaltung der FSS durch Acylierung mit zyklischen Dicarbonsäureanhydriden	11
I 1 Dissoziationsbedingungen	14
I 2 Analytik der Spaltung in der Ultrazentrifuge	16
I 3 Analytik der Spaltgemische nach spezifischer radioaktiver Markierung der Untereinheit α	19
I 4 Bestimmung des Blockierungsgrades freier Aminogruppen der FSS und Acylierung	21
I 5 Verhalten von Teilaktivitäten nach Spaltung mit CA und DMMA	23
II Rekonstitution des Komplexes nach Spaltung durch Acylierung mit DMMA	24
II 1 Bedingungen für eine schonende Hydrolyse der Dimethylmaleinyllysinamide	25
II 2 Verhalten der Gesamtreaktion bei der Reakti- vierung	25
II 3 Analytik zur Reaktivierung	27
II 4 Reaktivierungsverhalten einiger Teilreaktionen	31
Zusammenfassende Diskussion zu den Kapiteln I und II	33
III Entwicklung eines analytischen Gelelektrophorese- systems zur Trennung von Proteinen ähnlicher Molekulargewichte	36
III 1 Proteinchemische Lokalisierung der Acetyl-, Malonyl- und Palmityltransferase	44
III 2 Anwendung der Kombination erschöpfender chemi- scher Modifizierung mit der Harnstoffgelelektro- phorese auf andere Proteine	46

	Seite
Zusammenfassende Diskussion zu Kapitel III	53
IV Präparative Isolierung der Untereinheiten α und β der FSS	54
IV 1 Versuche mit der präparativen Gelelektrophorese	54
IV 2 Isolierung der Untereinheiten durch Rohrzuckergradientenzentrifugation	57
IV 3 Analytik der isolierten Spaltstücke	60
IV 3 a Elektrophoresen	60
IV 3 b Aminosäureanalysen	63
IV 4 Teilaktivitäten in den isolierten Untereinheiten	66
IV 5 Aggregationsverhalten der isolierten Untereinheiten	71
Zusammenfassende Diskussion zu Kapitel IV	71
V Herstellung und Charakterisierung von Kaninchenantikörpern gegen die Untereinheiten	76
V 1 Zur Spezifität der Antikörper	77
V 2 Hemmverhalten	82
VI Elektronenmikroskopische Untersuchungen mit den Antikörpern gegen die Untereinheiten α und β	84
VI 1 Anreicherung von FSS-IgG-FSS-Komplexen	84
VI 2 Elektronenmikroskopische Untersuchung von FSS-IgG-FSS-Komplexen	86
Zusammenfassende Diskussion zu Kapitel VI	92
Ein Raummodell der FSS ()	
VII Vorläufige Versuche zur Isolierung von Teilkomplexen	98
Diskussion zu Kapitel VII	102
Experimenteller Teil	103
A Verwendete Geräte	103
B Enzyme und Chemikalien	104
C Synthesen	105

	Seite
D	Allgemeine analytische Methoden
1.	Proteinbestimmung
2.	Radioaktivitätsmessung
3.	Gehaltsbestimmung von Thioestern
4.	Gelelektrophoresen
a	Native Disk-Elektrophorese
b	SDS-Gelelektrophoresen
E	Isolierung der FSS
F	Versuchsbeschreibungen
1.	Zu Kapitel I 1
2.	Zu Kapitel I 2
3.	Zu Kapitel I 3
4.	Zu Kapitel I 4
5.	Zu Kapitel I 5
6.	Zu Kapitel II 1
7.	Zu Kapitel II 2
8.	Zu Kapitel II 3
9.	Zu Kapitel II 4
10.	Zu Kapitel III
11.	Zu Kapitel III 1
12.	Zu Kapitel IV 1
13.	Zu Kapitel IV 2
14.	Zu Kapitel IV 3 b
15.	Zu Kapitel IV 5
16.	Zu Kapitel V
17.	Zu Kapitel V 1
18.	Zu Kapitel V 2
19.	Zu Kapitel VI 1
20.	Zu Kapitel VI 2
21.	Zu Kapitel VII
Zusammenfassung	127
Literaturverzeichnis	129
Lebenslauf	

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

FSS	Fettsäuresynthetase
CoA, CoA-SH	Coenzym A
FMN	Flavinmononucleotid
IgG	Immunglobulin G
CA	Citraconsäureanhydrid
DMMA	Dimethylmaleinsäureanhydrid
ACP	Acyl carrier protein
E, mE	Einheit, Millieinheit
JAA	Jodessigsäure
JAM	Jodacetamid
CAM-	Carboxamidomethyl-
E	Extinktion
ΔE	Extinktionsänderung
OD	optische Dichte
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TEA	Triäthanolamin
Gu/HCl	Guanidiniumhydrochlorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
DEAE-	Diäthylaminoäthyl
KFA	komplettes Freund'sches Adjuvans
PPO	2,5-Diphenyloxazol
POPOP	1,4-Bis-2-(5-phenyloxazol)-benzol
^{14}C	Kohlenstoffisotop 14
Cl	Curie
IpM	gezählte Zerfälle pro Minute
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-nitro-benzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
Min.	Minuten
Sek.	Sekunden
NEM	N-Äthyl-maleinimid
pI	Isoelektrischer Punkt
V	Volumen
G	Gewicht

Einleitung

Mit dem Fortschritt in der Evolution werden Zellen in zunehmendem Maße in Funktionseinheiten untergliedert. Das Genmaterial im prokaryotischen Bakterium E.coli, zum Beispiel, ist eine zirkuläre DNS, die nicht getrennt vom übrigen Inhalt der Zelle vorliegt. In eukaryotischen Organismen, wie der Hefe, liegen die Chromosomen mit ihren Kernproteinen im Zellkern vor, der mit einer eigenen Membran verpackt ist. Daneben gibt es in der Hefezelle noch weitere Funktionseinheiten in Form von Organellen. Ihr prominentester Vertreter ist das Mitochondrium, die Energiestation der Zelle, das möglicherweise seinen Ursprung in den Bakterien hat (1).

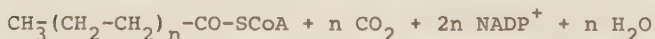
Innerhalb solcher Kompartimente findet man eine weitere Untergliederung und fixierte Lage von Funktionseinheiten, etwa die Ribosomen am rauhen endoplasmatischen Reticulum, oder die Komponenten der Atmungskette, die teilweise in die innere Mitochondrienmembran integriert sind.

Eine solche Kompartimentierung ermöglicht die Regulation und Kontrolle des Stoffwechsels, der mit fortschreitender Entwicklung der Zellen immer komplizierter wird. Als Konsequenz ergeben sich im wesentlichen folgende Vorteile:

Konkurrierende Seitenreaktionen werden durch Ausschluß der entsprechenden Enzymsysteme verhindert; die Diffusionswege für Reaktionszwischenprodukte sind minimal, da eine erwünschte Reaktionsfolge durch die entsprechende Organisation der Funktionseinheiten gewährleistet wird; die Metabolitenkonzentration in solchen Organellen ist größer, vergleicht man das Organellenvolumen mit dem Volumen der gesamten Zelle; und Enzyme, deren ungezielte Aktivität in der Zelle verderblich wäre, sind durch Verpackung vom übrigen Zellinhalt abgeschirmt, wie etwa manche Proteasen (2).

Als primitive Organellen im zytoplasmatischen Raum kann man die dort vorhandenen Multienzymkomplexe ansehen. Sie sind Funktionseinheiten, zusammengelagert aus Einzelenzymen, deren Reaktionsfolge für die Bildung eines Biosyntheseproduktes oder Intermediates notwendig ist. Ihr Zusammenhalt beruht lediglich auf Protein-Protein-Wechselwirkungen, anders als die Lipid-Protein-Wechselwirkungen in Organellenmembranen oder Nukleinsäure-Protein-Wechselwirkungen in den Kernkomplexen, den Nukleosomen. Dieser Zusammenhalt zum Multienzymkomplex bietet die meisten der für die Kompartimentierung genannten Vorteile.

Als ein solcher stabiler Multienzymkomplex wurde von Lynen 1961 die Fettsäuresynthetase (FSS) aus Hefe isoliert und erkannt. Dieser Komplex ist in der Lage, die gesamte Reaktionsfolge in der Biosynthese langkettiger Fettsäure-CoA-Verbindungen gemäß der folgenden Gleichung zu katalysieren (3):



Die Endprodukte des Hefesystems sind Palmityl- und Stearyl-CoA ($n = 7$ bzw. 8).

Der Hefe-Komplex ist Bestandteil des zytoplasmatischen Raumes und hat ein Molekulargewicht von $2,3 \times 10^6$ Dalton (4,5). In anderen Pilzen und im tierischen Gewebe liegen die Fettsäuresynthetase-Enzyme ebenfalls in komplexer Form vor (7,8,9), während aus Pflanzen und Bakterien für jede Teilstufe des Biosynthesewegs Einzelenzyme isoliert wurden (10,11).

Mit Hilfe von synthetischen Modellsubstraten war es Lynen möglich, die einzelnen Teilschritte des Syntheseablaufs auf-

zuklären (12). Sie sind schematisch in Abb. 1 dargestellt.

Während der gesamten Reaktionsfolge sind die Zwischenprodukte kovalent an den Multienzymkomplex gebunden, bis die Endprodukte Palmitat oder Stearat auf freies Coenzym A übertragen werden.

Die im folgenden beschriebene Abfolge von Einzelreaktionen hat sich (bis auf die terminierende Reaktion) inzwischen als gültig für alle Fettsäure synthetisierenden Systeme herausgestellt, gleichgültig welcher Herkunft sie sind, oder ob es sich bei den Enzymen um Komplexe oder Einzelproteine handelt. Lediglich die Endreaktion ist unter den Organismen verschieden. In Pflanzen und tierischen Organismen, zum Beispiel, wird die gebildete Fettsäure nicht auf Coenzym A übertragen, sondern auf Wasser und erscheint damit als freies Salz.

Zwei SH-Gruppen sind an der Synthese beteiligt. Sie wurden von Lynen als "zentrale" und "periphere" SH-Gruppe bezeichnet. Die zentrale SH-Gruppe ist Bestandteil eines 4'-Phosphopantheteins, das über Serin mit Protein verknüpft ist, dem Acyl Carrier Protein (ACP). Die periphere SH-Gruppe ist das Thiol eines Cysteins im aktiven Zentrum des kondensierenden Enzyms. Zwei Transferaseteilenzyme übertragen Acetat und Malonat von Coenzym A auf die zentrale SH-Gruppe. Acetat (und im Verlauf der Synthese die gesättigten Fettsäuren zwischen C_4 und $C_{14} - C_{16}$) wird nun auf die periphere SH-Gruppe übertragen. Es erfolgt die Kettenverlängerung: Acetat kondensiert mit ACP-gebundenem Malonat unter gleichzeitigem Austritt von CO_2 (13), wodurch die Verknüpfung der beiden Reste thermodynamisch begünstigt wird (14). Der gebildete C_4 -Rest bleibt während der folgenden Teilreaktionen am ACP verankert und erreicht durch die Flexibilität des 4'-Phosphopantheteins (ca. 20 Å Länge) die aktiven Zentren der nachfolgenden Teilenzyme:

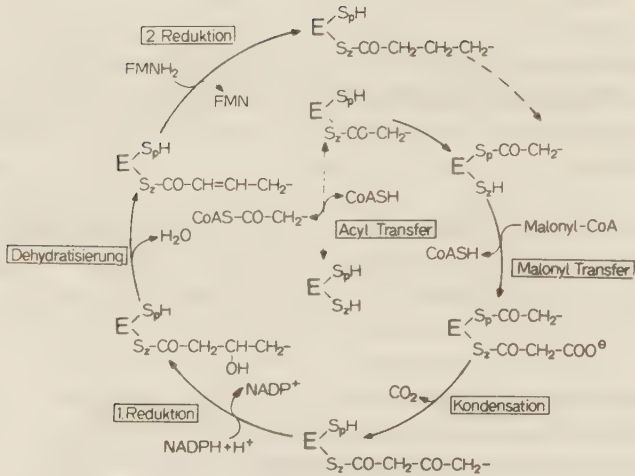


Abb. 1 Verlauf der Fettsäurebiosynthese nach Lynen (12).

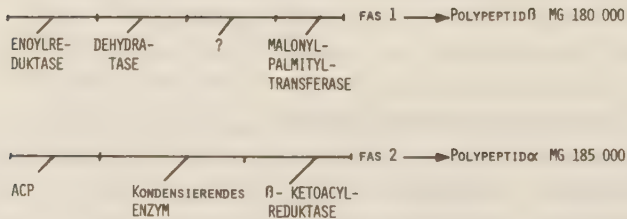


Abb. 2 Genloci und Genprodukte für FSS nach Schweizer (6,15).

β -Ketoacylreduktase: Der β -Ketoacylrest wird unter Verbrauch eines NADPH zum β -Hydroxyacylrest reduziert (1. Reduktion).

Dehydratase: Der β -Hydroxyacylrest wird zum Δ^2 -Enoylrest dehydratisiert.

Δ^2 -Enoylreduktase: Der Δ^2 -Enoylrest wird unter Verbrauch eines zweiten NADPH unter der Beteiligung des Coenzym FMN zum gesättigten Fettsäurerest reduziert (2. Reduktion).

Der entstandene gesättigte Fettsäurerest wird auf die periphere SH-Gruppe übertragen, das ACP nimmt einen weiteren Malonsäurerest auf, es erfolgt erneute Kondensation und anschließende Umwandlung zum gesättigten, um eine C_2 -Einheit verlängerten Fettsäurerest. Nach sieben oder acht solchen Umläufen wird die Reaktion dadurch abgebrochen, daß der gesättigte C_{16} - oder C_{18} -Rest nicht mehr auf die periphere Thiolgruppe rückübertragen wird, sondern die Palmityltransferase das Produkt aus dem Komplex schleust und auf freies CoA überträgt (16).

In der Vergangenheit sind viele Untersuchungen zur Untereinheitenstruktur dieses großen Komplexmoleküls angestrengt worden (17-20).

Sumper gelang es 1970, den Komplex reversibel in kleinere Komponenten zu zerlegen, indem er ihn in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen wiederholt auf -70°C einfrore und auftaute. Analysen des Spaltgemischs ergaben, daß die kleinsten Proteinkomponenten, die vorlagen, ein Molekulargewicht um 200 000 besaßen (21).

1973 zeigte Schweizer auf Grund eingehender genetischer Untersuchungen mit Hefemutanten, die in einzelnen Teilreak-

tionen defekte FSS-Komplexe aufwiesen, daß für alle oben aufgeführten Teilfunktionen nur zwei von einander getrennte Genloci kodieren, nämlich fas 1 und fas 2. Nach dem Schema in Abb. 2 kodiert fas 2 für das ACP, die β -Ketoacylreduktase und das kondensierende Enzym; fas 1 für die Malonyltransferase, die Palmityltransferase, die Dehydratase und die Enoylreduktase. Die Produkte der beiden Genloci wurden mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analytisch voneinander getrennt und ihre Molekulargewichte mit dieser Methode auf 185 000 (α) und 180 000 (β) geschätzt (22).⁺)

Große Einzelproteine katalysieren also mehrere verschiedene Teilreaktionen; der Komplex ist aus zwei multifunktionalen Polypeptidketten aufgebaut.

In dem eingangs erwähnten Übergang in der Evolution von Einzelenzymen zu assoziierten Komplexsystemen ist hier eine noch weitergehende Form der Assoziation verwirklicht: Die kovalente Verknüpfung von Einzelenzymen zu großen multifunktionalen Proteinen, die ihrerseits zu einem Komplex zusammengelagert sind. Beispiele hierfür sind von anderen Systemen bekannt: Einzelenzyme der Tryptophansynthese in *E.coli* - in Hefe sind zwei davon auf einer Polypeptidkette angeordnet (23,24). Auch die Acetyl-CoA-Carboxylasen der beiden Systeme unterscheiden sich auf diese Weise: Drei Einzelenzyme in *E.coli* - in Hefe eine Proteinkette mit drei Funktionen (25,26). Bei der Biosynthese von anderen Aminosäuren in Eukaryonten scheinen ebenfalls solche multifunktionalen Polypeptide vorzuliegen. Coggins (27) beschreibt einen "Aromkomplex" aus *Neurospora crassa*, aufgebaut aus nur einem Untereinheitentyp, der fünf verschiedene Reaktionen auf dem Syntheseweg zu aromatischen Aminosäuren katalysiert.

Sehr wahrscheinlich sind solche multifunktionalen Polypeptide entstanden durch die Fusion nebeneinander liegender Gene, die für die Einzelenzyme kodierten. Einen experimentellen Hinweis hierauf lieferten Arbeiten von Yourno und

Kohno (28) mit zwei Enzymen der Histidin-Biosynthese.

Als einer der Hauptgründe für eine solche Verschmelzung wird das Problem der Kontrolle der stöchiometrischen Synthese von Einzelenzymen diskutiert, die einen Multienzymkomplex aufbauen (29). Im Fall der FSS aus Hefe müssen nur mehr zwei statt acht Polypeptidketten synchron für den Aufbau des Multienzymkomplexes zur Verfügung gestellt werden. Diesem Argument scheint jedoch die Tatsache zu widersprechen, daß beispielsweise die mitochondrialen Multienzymkomplexe wie α -Ketoglutaratdehydrogenase oder Pyruvatdehydrogenase mit ihren noch größeren Molekulargewichten gegenüber der Hefe-FSS aus relativ kleinen Einzelenzymen aufgebaut sind, die bis zu etwa 60 Mal im Komplex vorkommen (30,31). Möglicherweise hängt dies jedoch mit Problemen beim Transport sehr großer Proteine nach ihrer Synthese durch die Mitochondrienmembran zusammen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Untereinheiten der FSS aus Hefe im präparativen Maßstab zu isolieren, um sie zu charakterisieren und weiteren Einblick in die Struktur dieses großen und stabilen Multienzymkomplexes zu gewinnen.

+) Es werden die in der Enzymologie üblichen griechischen Buchstaben zur Bezeichnung von Proteinuntereinheiten verwendet. Dabei bedeuten:
Schweizers (22) A = α , C = α' und B = β .

Ergebnisse

Vorbemerkung

Als Begründung für die im folgenden beschriebene recht ungewöhnliche Methode der Spaltung des Komplexes und die präparative Isolierung seiner Untereinheiten durch chemische Modifizierung wird ein knapper Überblick gegeben über Versuche, den Komplex mit verschiedenen Detergentien zu spalten, und über die Schwierigkeiten, die sich bei herkömmlichen Trenn- und Anreicherungsverfahren für die Untereinheiten ergaben.

Auf Grund der von Schweizer gezeigten quantitativen Spaltung der FSS mit SDS wurde zunächst versucht, den Komplex nach SDS-Behandlung zu reaktivieren. Zum Nachweis auch kleiner Mengen des Detergens wurde radioaktives ^{14}C -SDS in Anlehnung an die von Jerchel et al. für ^{35}S -SDS angegebene Methode hergestellt (33). Damit konnte nachgewiesen werden, daß es möglich war, über basische Ionenaustauscher in Gegenwart von Harnstoff mindestens 99,9 % des proteingebundenen SDS abzutrennen. Solche Methoden sind in der Literatur beschrieben (34, 35). Jedoch war es nicht möglich, aus solchen, von SDS befreiten Spaltgemischen die Gesamtaktivität oder auch nur Einzelaktivitäten des Enzyms zu reaktivieren. Der Hauptgrund hierfür ist darin zu sehen, daß FSS-Protein aus Lösungen mit hoher Molarität an Harnstoff, wie sie zur Abtrennung von SDS nötig sind, nicht in löslicher Form zurückerhalten werden kann, sondern quantitativ irreversibel präzipitiert. Ähnliche Beobachtungen hatte bereits Willecke gemacht (18).

Da einige Versuche zu einer schonenderen Abtrennung von SDS durch Verschiebung des Bindungsgleichgewichts, wie zum Beispiel Gelchromatographie in Gegenwart von Rinderserumalbumin, Dialyse gegen rinderserumalbuminhaltige Puffer, oder Inkubation mit überschüssigem Poly-Lysin keine nennens-

werten Erfolge gebracht hatten, zielten weitere Anstrengungen auf die Isolierung wenigstens der denaturierten, inaktiven Untereinheiten. Jedoch erbrachten Chromatographie an Hydroxylapatit in Gegenwart von SDS (36), Ionenaustauschchromatographien von mit Harnstoff gespaltenen Enzymproben, Isofokussierungsversuche in Gegenwart von Harnstoff im Sucrosegradienten (37), in der Zonenkonvektionsapparatur (38) sowie im granulierten Flachgelbett (39), präparative Gelelektrophoresen von Desoxycholat-behandelter FSS (17), Chromatographieversuche von LiCl-gespaltener FSS an aktivierter Thiol-Sephrose (40, 41) und andere Anstrengungen keine Auftrennung in homogene Proteine. Die Gründe hierfür liegen in der großen Ähnlichkeit der beiden Polypeptide, hinsichtlich ihrer Molekulargewichte und sehr wahrscheinlich auch ihrer isoelektrischen Punkte, die man auf Grund der Erfahrungen mit der isoelektrischen Fokussierung grob auf $\text{pH } 6 \pm 0.2$ für Harnstoff-denaturierte Untereinheiten einordnen muß. Es sei erwähnt, daß Schweizer inzwischen die Auftrennung der denaturierten und inaktiven Untereinheiten im 100-Mikrogramm-Maßstab durch Isofokussierung beschrieben hat, und zwar in Gegenwart der unüblich hohen Konzentration von 40 % Ampholinen. Die erhaltenen Proteine waren jedoch weder reaktivierbar, noch in der Lage, die Bildung von Antikörpern gegen das native Enzym zu stimulieren (29, 42). Isoelektrische Punkte für die beiden denaturierten Untereinheiten wurden nicht angegeben.

Sumper (19) und später Weithmann (20) hatten vergeblich versucht, das Spaltgemisch aufzutrennen, das nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen des Komplexes in Gegenwart von 1 M LiCl entsteht. Ähnliche Versuche mit der präparativen Gelelektrophorese schlugen auch bei uns fehl. Sehr wahrscheinlich entsprechen die einzelnen Banden, die auf der analytischen Diskelektrophorese solcher Spaltgemische erscheinen, nicht homogenen Einzelproteinen, sondern repräsentieren ein Gemisch der Untereinheiten in verschiedenen Aggregationszuständen.

Versuche, eine von Porter's Gruppe beschriebene Affinitätschromatographie nachzuvollziehen, wie sie zur Isolierung der Untereinheiten von FSS aus Taubenleber (43) und später auch aus Hefe (44) benutzt worden sein soll, waren ebenfalls ergebnislos. Schon die beschriebene Spaltmethode führte nicht zur Dissoziation, sondern schädigte die Gesamtaktivität der Hefe-FSS nur unwesentlich. Auf diese Veröffentlichungen wird an geeigneter Stelle noch eingegangen.

Aus all den genannten Versuchen ging für uns hervor: Die Hauptschwierigkeiten lagen in der Stabilität des Komplexes und in der Ähnlichkeit seiner Untereinheiten. Ein sinnvoller Weg schien deshalb, den Komplex chemisch zu modifizieren, in der Hoffnung, daß man dadurch die Untereinheit eines Typs in stärkerem Ausmaß verändere als die andere. Dann sollten sich die nun verschiedenen Untereinheiten mit in der Proteinchemie üblichen Verfahren isolieren lassen.

I Spaltung der FSS durch Acylierung mit zyklischen Dicarbonsäureanhydriden

Eine geeignete funktionelle Gruppe zur chemischen Modifizierung in Proteinen ist die ϵ -Aminogruppe des Lysins, deren Reaktion mit vielen Reagentien in der Literatur beschrieben ist. Da diese, bis auf den N-Terminus, die einzige freie Aminogruppe in Polypeptiden ist, kann Lysin recht spezifisch derivatisiert werden. Ist nun die Anzahl leicht zugänglicher Aminogruppen in den beiden Untereinheiten im Komplex verschieden, dann sollte eine vorsichtige chemische Modifizierung die eine Untereinheit in ihren elektrophoretischen Eigenschaften stärker verändern als die andere. Zur Verstärkung eines herbeigeführten Ladungsunterschieds schien es sinnvoll, mit Dicarbonsäureanhydriden zu arbeiten. Abb. 3 gibt einen Überblick über die möglichen Reaktionen von Dicarbonsäureanhydriden des Maleinsäuretyps mit reaktiven Gruppen von Aminosäuren im Polypeptidverband.

Die Acylierung der ϵ -Aminogruppe von Lysin mit solchen Anhydriden neutralisiert nicht nur die im sauren oder neutralen Bereich vorliegende positive Ladung des Amins, sondern führt darüber hinaus über die freie Carboxylfunktion des entstandenen Dicarbonsäureamids eine negative Ladung ins Protein ein. Netto wird also die Gesamtladung eines Proteins um zwei negative Ladungen geändert, wenn eine Aminogruppe auf die beschriebene Weise acyliert wird.

Entstehen nun solche neuen Ladungsverhältnisse an Orten im Komplex, an denen eine ionisch geartete Protein-Proteinwechselwirkung zur Bindung von Untereinheiten beiträgt, kann dies zur Dissoziation führen, wie dies im Fall der Aldolase beschrieben ist (45). Die Autoren behandelten das Enzym mit steigenden Mengen von Citraconsäureanhydrid und verfolgten den Spaltungsgrad des Komplexes durch Flächenvergleich der Gipfel in der analytischen Ultrazentrifuge. Komplette Dissoziation war erreicht, nachdem

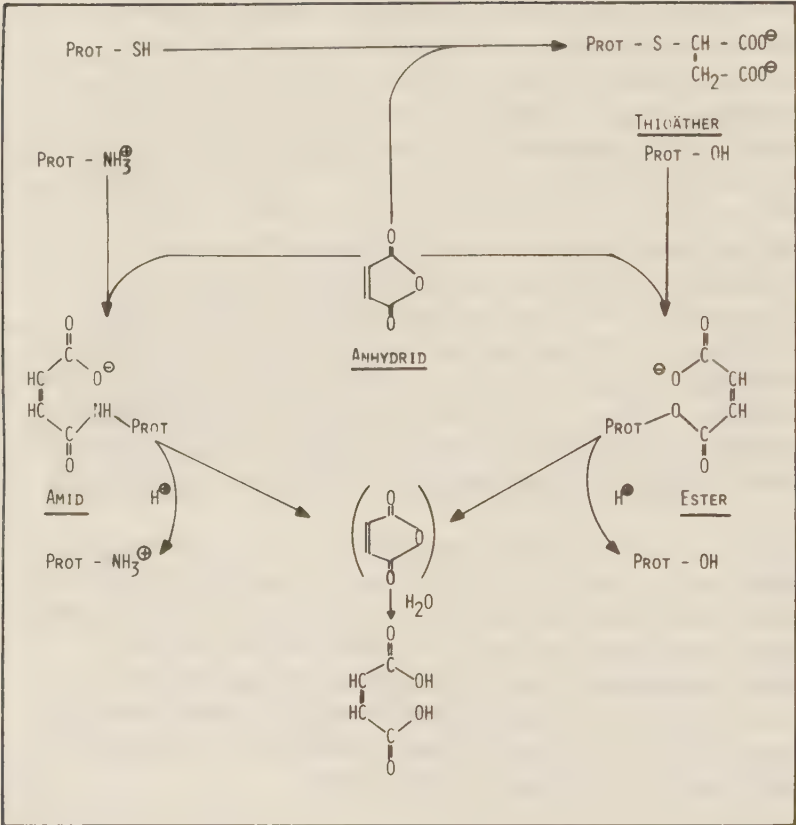


Abb. 3

Reaktionen zyklischer Dicarbonsäureanhydride des Maleinsäuretyps mit funktionellen Gruppen von Aminosäuren im Polypeptidverband (45,46,47).

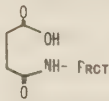
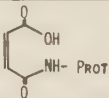
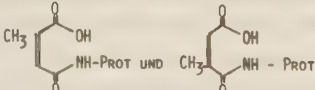
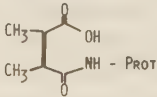
80 % aller Aminogruppen acyliert waren. Beschriebene Nebenreaktionen zyklischer Dicarbonsäureanhydride wie Maleinsäureanhydrid (MA), Citraconsäureanhydrid (CA) und Dimethylmaleinsäureanhydrid (DMMA) mit Proteinen sind zum einen Alkylierung von Sulfhydrylgruppen unter Bildung von Thioäthern, ähnlich der Reaktion des häufig verwendeten Schwefelgifts N-Äthylmaleimid, und zum anderen die Acylierung von Hydroxylgruppen unter Bildung der entsprechenden Ester (vgl. Abb. 3). Diese Ester sind jedoch im Gegensatz zu den Amidien recht labil und werden unter den in der Proteinchemie üblichen Bedingungen schnell hydrolysiert und stören deshalb nicht (48). Um die irreversible Alkylierung von Thiolen zu verhindern, kann man solchen Acylierungsansätzen entweder einen Überschuß an freiem Thiol gegenüber Proteinthiol zusetzen, oder die Proteinthiole vor der Acylierung der Amine reversibel maskieren, beispielsweise mit Ellmans Reagens (49) oder mit p-Hydroxymecuribonzoat. Wir wählten die erste Methode, da wir die chemische Modifizierung möglichst schonend vornehmen wollten, und wenig über mögliche Strukturänderungen der FSS nach Behandlung mit Schwefelgiften bekannt ist.

Als Dicarbonsäureanhydride wurden CA und DMMA eingesetzt. CA, weil für anfängliche Versuche eine relativ große Stabilität der Amidderivate wünschenswert war (siehe Tab. 1), die eine breitere Variation des pH-Werts während proteinchemischer Arbeiten erlaubt, und DMMA wegen der relativ großen Labilität des entsprechenden Amids bereits im schwach sauren Milieu, die im Sinne einer Reaktivierung solcher Modifikationsansätze angestrebt wurde.

Die steigende Labilität der Amide im Säuren mit zunehmender Methylierung der Maleinsäuregruppierung resultiert aus der Tatsache, daß die Hydrolyse intramolekular katalysiert wird und über die Stufe des Anhydrids abläuft (51). Der sterische Einfluß der Methylgruppen begünstigt die Bildung des Anhydrid-Fünfringes.

Tabelle 1 (47,50)

STABILITÄT VERSCHIEDENER DICARBONSÄURELYSYLAMIDE

ANHYDRID	PROT - LYSYL - DERIVAT	HALBWERTSZEIT PH 3,5
BERNSTEIN- SÄURE		STABIL
MALEINSÄURE		11 h, 37°C
CITRACON- SÄURE	 CH ₃ NH-PROT UND CH ₃ NH - PROT	2 h, 20°C
DIMETHYL- MALEINSÄURE		2 MIN., 20°C

I 1 Dissoziationsbedingungen

Es wurden nun Dissoziationsbedingungen für den Komplex gesucht, die bei kompletter Spaltung in die Untereinheiten möglichst noch Aktivität in einzelnen Teilreaktionen erlauben sollten. Zu diesem Zweck wurde die Desaktivierung der Gesamtreaktion in Abhängigkeit von der Konzentration an CA und in Abhängigkeit vom pH-Wert der Inkubationen verfolgt. Ebenso wurde mit DMMA verfahren. Parallel dazu wurde das Ausmaß der Spaltung auf der Disk-Gelelektrophorese

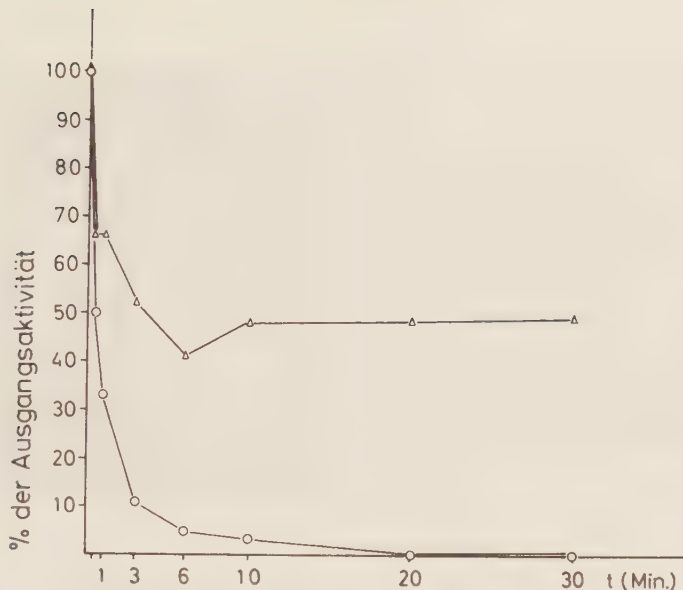


Abb. 4 Zeitverlauf der Desaktivierung der Gesamtreaktion und der Acetyltransferase durch Acylierung freier Aminogruppen der FSS: FSS wurde mit 10 mM DMMA inkubiert, zu den angegebenen Zeitpunkten durch Zugabe von Lysin gestoppt und die Aktivität der Gesamtreaktion sowie der Acetyltransferase bestimmt (Durchführung s. exp. Teil).

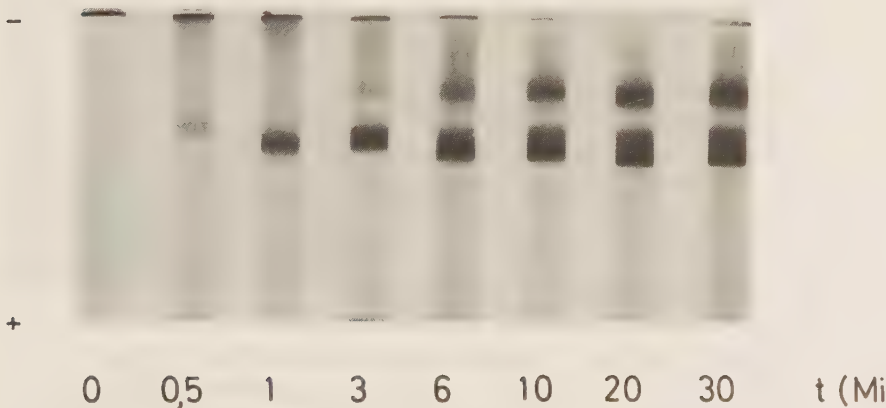


Abb. 5 Analytische Disk-Gelelektrophorese zu Abb. 4: Jeweils ca. 30 µg-Aliquote der abgestoppten Inkubationen wurden auf 5 %igen Acrylamidgelen elektrophoretisiert. System Maurer 1 (52) (Durchführung s. exp. Teil).

verfolgt. Dabei stellte sich ein pH von 7,5 und eine Konzentration von 10 mM an Anhydrid sowohl bei Anwendung von CA als auch von DMMA als günstig heraus. Bei 0°C desaktivierte nämlich die Gesamtreaktion schnell, auf der Gelelektrophorese erschienen Proteinbanden, deren Molekulargewichte viel kleiner sein mußten als das Molekulargewicht des Komplexes, und trotz dieser Aufspaltung war beispielsweise die Aktivität der Acetyltransferase noch gut meßbar. In Abb. 4 ist der Zeitverlauf der Desaktivierung der Gesamtreaktion dargestellt und verglichen mit dem Verhalten der Acetyltransferase unter den gleichen Bedingungen. Abb. 5 zeigt die gelelektrophoretische Analyse von Proben, die zu den beschriebenen Zeitpunkten den Acylierungsansätzen entnommen und durch Verdünnen mit lysinhaltiger Lösung "abgestoppt" worden waren. Aus diesen Ergebnissen ergaben sich für eine schonende Spaltung der FSS durch chemische Modifizierung folgende Bedingungen: 0,3 M KPO_4 , pH 7,5, 10 mM CA oder DMMA, 10 mM 2-Mercapto-äthanol, Inkubation für 30 min bei 0°C.

Diese werden im folgenden Standardbedingungen genannt.

I 2 Analytik der Spaltung in der Ultrazentrifuge

Solche Standardspaltansätze wurden nun in der analytischen Ultrazentrifuge untersucht. Als interner Standard wurde bei diesen Läufen nativer Komplex, dessen Sedimentationskonstante zu 40 S bestimmt worden war (5,92), in "wedge"-Zellen mituntersucht. Überraschenderweise wanderten die Spaltansätze mit einer unveränderten Sedimentationskonstante von 40 S entsprechend nativer FSS (siehe Abb. 6a). Da in der Diskelektrophorese mit den gleichen Ansätzen eine Auftrennung in zwei Proteinbanden beobachtet worden war (vgl. Abb. 5) und natives Enzym in die verwendeten 5 %igen Polyacrylamidgele nicht einzuwandern vermag, wurde vermutet, daß entweder die Kräfte im elektrischen Feld der Elektrophorese oder einfach ihr Puffersystem zur Dissoziation ge-

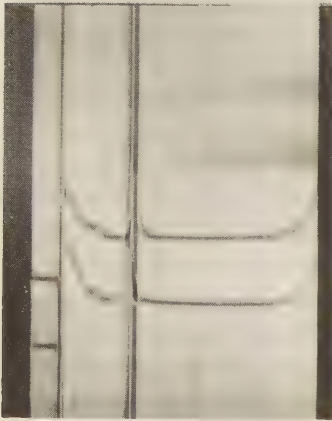


Abb. 6 a

Analytische Ultrazentrifugation von FSS nativ (oben, wedge-Zelle) und FSS-DMMA Standardspaltansatz (unten, Normal-Zelle). Protein-konzentration in beiden Fällen 5.7 mg/ml, FSS nativ lag im Standardspaltpuffer vor, dem 10 μ Mol Dimethylmaleinsäure/ml und 13 μ l THF/ml zugegeben worden waren. Aufnahme 7 Min. nach Erreichen der Höchstgeschwindigkeit (59 760 UpM). Rotor AND 3010, Temperatur etwa 2°C.

→
SEDIMENTATION

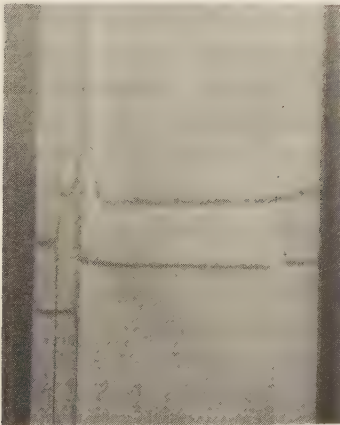


Abb. 6 b

Analytische Ultrazentrifugation von FSS nativ (unten, Normal-Zelle) und FSS-DMMA-Standardspaltansatz (oben, wedge-Zelle), beide in 0.1 M Tris/HCl pH 7.5, 1 mM DTT umäquilibriert. FSS nativ: 3.3 mg/ml, FSS-DMMA: 3.8 mg/ml. Aufnahme 13 Min. nach Erreichen der Höchstgeschwindigkeit, Lauf wie oben.

→
SEDIMENTATION

führt hatte. Ein Lauf in der analytischen Ultrazentrifuge mit einem DMMA-Standardspaltansatz, der nach Acylierung durch Gelfiltration mit einem verdünnten Trispuffer ähnlich dem Elektrophoresepuffer äquilibriert worden war, bestätigte die zweite Annahme: Nun sedimentierte das modifizierte Protein wesentlich langsamer als der native Komplex, und zwar mit 2,8 - 5,5 S. (Diese Werte sind Extremwerte, die bei 12 Läufen erhalten wurden.) (Vgl. Abb. 6b).

Somit war eine quantitative Spaltung des Komplexes erreicht, jedoch erschienen die S-Werte der Spaltgemische sehr klein für ein Proteingemisch mit einem Molekulargewicht um 180 000, wie es von Schweizer auf der SDS-Gelelektrophorese abgeschätzt worden war (22). Das tetramere Enzym Aldolase, zum Beispiel, mit einem Molekulargewicht um 160 000 (53) sedimentiert mit etwa 8 S. In der SDS-Gelelektrophorese wanderten die Komponenten des DMMA-Spaltgemisches aber identisch mit den Komponenten des nicht modifizierten Enzyms. Die sehr kleinen Sedimentationskonstanten entsprechen also nicht kleineren Molekulargewichten der Spaltstücke, sondern sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die Polypeptidketten in einem teilweise entfalteten Zustand vorliegen, der gegenüber globulären Proteinen einen höheren Reibungskoeffizienten und damit kleinere Sedimentationskonstanten verursacht (54).

Sedimentationsläufe in der analytischen Ultrazentrifuge sind daher nicht zu einer Molekulargewichtsabschätzung solcher Spaltansätze geeignet. Im Gegensatz hierzu läßt sich das Molekulargewicht von Proteinen unabhängig von ihrer Form durch Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichtsläufe ermitteln (55). Mit dieser Methode wurde für das Spaltgemisch nach CA-Standardbehandlung und Äquilibrieren mit dem erwähnten Puffer ein Molekulargewicht von 167 000 $\pm$ 15 000 Daltons ermittelt.⁺⁾

⁺⁾ Für die Durchführung dieser Diffusionsgleichgewichtsläufe bin ich Herrn Dr. Prieß, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, zu großem Dank verpflichtet.

Dieser Wert steht in nicht zu schlechter Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der SDS-Gelelektrophorese (22).

I 3 Analytik der Spaltgemische nach spezifischer radioaktiver Markierung der Untereinheit α

Handelte es sich bei den deutlich voneinander getrennten Proteinbanden, die man auf der analytischen Gelelektrophorese erhielt, um die beiden Untereinheiten α und β , oder stellte jede dieser Banden ein Gemisch der Untereinheiten dar, waren also lediglich zwei verschieden stark acylierte Populationen von Untereinheitengemisch entstanden? Um diese Frage zu entscheiden, war es wünschenswert, eine Untereinheit spezifisch radioaktiv zu markieren. Frühere Arbeiten im Lynen'schen Labor hatten gezeigt, daß das Schwefelgift Jodacetamid unter bestimmten Bedingungen ganz spezifisch ausschließlich die Kondensationsreaktion der Fettsäuresynthese hemmt (17,56,57). Eine Partialsequenz um das aktive Zentrum des kondensierenden Enzyms nach einer solchen Modifizierung mit Jodacetamid ist inzwischen bekannt (58). Zusammen mit Schweizer konnte Kresze außerdem durch Markierung mit radioaktivem Jodacetamid zeigen, daß das aktive Cystein des kondensierenden Enzyms auf der Polypeptidkette α lokalisiert ist (59).

Diese hochspezifische Markierung der Untereinheit α nutzten wir zur Analytik des Spaltmusters in der analytischen Gelelektrophorese: FSS, die mit ^{14}C -Jodacetamid in α beladen war, wurde Standardspaltbedingungen und anschließend der Disk-Gelelektrophorese unterworfen. Nach Anfärben der Gele auf Protein wurden sie in Scheibchen gleicher Dicke zerschnitten und die Radioaktivität der Fraktionen bestimmt. Abb. 7 zeigt die Verteilung der Radioaktivität in einem solchen Gel. Alle Radioaktivität war in die langsamer wandernde Proteinbande inkorporiert, bei der es sich demnach um Untereinheit α handelt. Die Tatsache, daß alle Radioaktivität ausschließlich in einer Bande

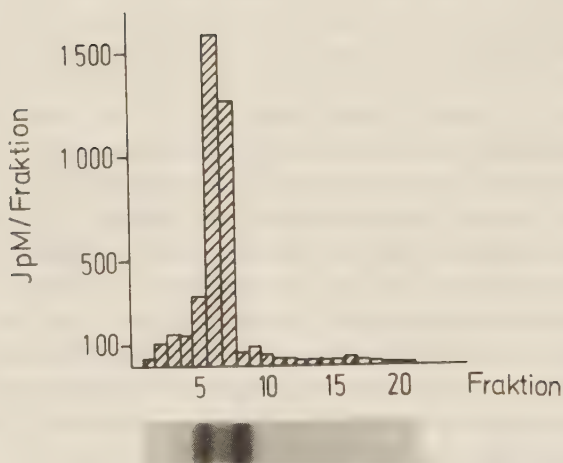


Abb. 7

Radioaktivitätsverteilung nach spezifischer Markierung der Untereinheit α der FSS durch Behandlung mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -JAM, anschließender DMMA-Standardspaltung auf Auftrennung in der analytischen Gelelektrophorese: FSS wurde nach (57) mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -JAM (0.8 mM, spez. Radioaktivität $57\text{ }\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$) inkubiert, nach Abtrennung von überschüssigem radioaktiven JAM der DMMA-Standardspaltung unterworfen und im System Maurer 1 (52) der Elektrophorese unterworfen (5 %iges Gel, ca. 20 μg Protein aufgetragen). Nach Anfärben und Entfärben wurde das Gel in gleich dicke Scheibchen zerschnitten und die Radioaktivität dieser Fraktionen bestimmt (Ausführung s. exp. Teil).

gefunden wurde, bedeutet, daß die chemische Modifizierung zu einem Spaltgemisch geführt hatte, das sich durch Gelelektrophorese deutlich in die zwei Untereinheiten der FSS auftrennen ließ. Dies eröffnete einen Weg zu einer präparativen Isolierung der Untereinheiten α und β , die im Kapitel IV beschrieben ist. Zudem war das Ergebnis ein weiterer Hinweis darauf, daß die Dissoziation des Komplexes unter den angegebenen Bedingungen quantitativ erfolgt war.

I 4 Bestimmung des Blockierungsgrades freier Aminogruppen der FSS nach Acylierung

Um die Zahl der acylierten Aminogruppen der FSS nach quantitativer Spaltung des Komplexes zu bestimmen, wurde eine Methode von Habeeb et al. angewendet (60):

Freie Aminogruppen reagieren mit Trinitrobenzolsulfonsäure zum Anilino-Derivat, welches gelb gefärbt ist:



Die Messung erfolgt photometrisch bei 335 nm. Die Anzahl der blockierten Aminogruppen ergibt sich dann durch die Differenz der Anzahl freier Gruppen vor und nach Acylierung. Das Ergebnis dieser Messungen ist in Abb. 8 dargestellt. Aus den Werten ergibt sich, daß bei quantitativer Spaltung (Standardbedingungen) etwa 28 % aller Aminogruppen acyliert sind.

Der Wert für die Anzahl freier Aminogruppen im nativen Komplex, erhalten mit der TNBS-Methode, korreliert ganz gut mit der Zahl von Lysinen im Komplex, bestimmt mit der

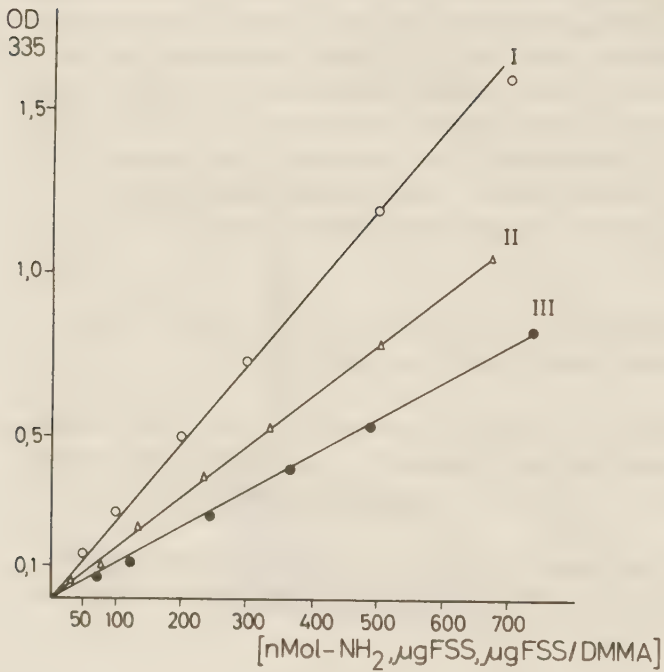


Abb.8 : Bestimmung freier Aminogruppen der FSS mit TNBS vor und nach Acylierung des Enzyms mit DMMA.
I: ϵ -Aminocapronsäure-Eichkurve
II: FSS vor DMMA-Standardbehandlung
III: FSS nach DMMA-Standardbehandlung
Alle Proben lagen in 0,02 M K-Phosphat-Puffer pH 8,5 vor (Durchführung siehe exp. Teil).

Aminosäureanalyse (siehe Kapitel IV). (Vgl. auch Tab. 2).

Tabelle 2

ANZAHL FREIER AMINOGRUPPEN DER FSS +)

MIT DER TNBS - METHODE BESTIMMT		ANZAHL DER LYSINE AUS DER AMINOSÄURE- ANALYSE (VGL. KAP. IV)
FSS NATIV	FSS / DMMA	
1491	1038	1485

I 5 Verhalten von Teilaktivitäten nach Spaltung mit CA und DMMA

In den Tabellen 3a und 3b sind die Prozentsätze an Teilaktivitäten aufgeführt, die nach Standardbehandlung mit CA bzw. DMMA und Äquilibrieren mit Tris-Puffer noch gemessen werden konnten.

Tabelle 3 a, b und c

Aktivität	a	b	c
Gesamtreaktion	0	0	0
β -Ketoacylsynthase	≤ 2	≤ 2	0
β -Ketoacylreduktase	0	0	0
Malonyltransferase	≤ 15	≤ 6	60
Acetyltransferase	54	55	100
Dehydratase	87	100	95
Enoylreduktase	25	15	100 (0)

+) An freien Aminogruppen werden nur ϵ -Aminogruppen von Lysin erfaßt, da die N-Termini der Untereinheiten der FSS blockiert sind (61).

Diese Werte werden mit dem Verhalten von Teilaktivitäten nach der Sumper'schen LiCl-Spaltung verglichen (Tab. 3c). Die quantitative Spaltung durch Acylierung führt offensichtlich zu einem größeren Verlust an Teilaktivitäten, jedoch zeigen sich deutliche Gemeinsamkeiten: Die Kondensationsreaktion und die β -Ketoacylreduktase sinken unter allen Bedingungen auf Null ab. Die Dehydratase und die Acetyltransferase sind jeweils die stabilsten Teilenzyme. Der Verlust an Aktivität der Enoylreduktase dürfte vor allem auf Dissoziation des Coenzyms FMN zurückzuführen sein, zumindest bei der LiCl-Spaltung. Diese Teilaktivität reaktiviert nämlich schlagartig unter Bedingungen, die zu einer Rekonstitution des Komplexes führen, im Gegensatz zu den übrigen vorher geschädigten Reaktionen, die im Verlauf von Minuten (Malonyltransferase) oder Stunden (Kondensation) reaktivieren.

II Rekonstitution des Komplexes nach Spaltung durch Acylierung mit DMMA

Der Einsatz von CA zu einer reversiblen Dissoziation der FSS erwies sich als ungünstig, da die Bedingungen der Hydrolyse (Langzeitinkubation im relativ stark sauren Milieu, um pH 3,5) der Citraconylamide das Protein irreversibel schädigten. Deshalb wurde bei Experimenten, die auf eine Rekonstitution des Komplexes abzielten, DMMA verwendet. Die Halbwertszeit seines Lysylamids ist ca. 2 min bei pH 3,5 und 20°C (47) (vgl. Tab. 1). Puigserver et al. (62) dialysierten DMMA-behandelte Procarboxypeptidase A aus Rinderpankreas über Nacht in der Kälte gegen schwach saure Puffer (um pH 6) und erreichten dadurch eine quantitative Hydrolyse der Amide. Diese Methode erwies sich im Fall der FSS als ungeeignet, da der größte Teil des Proteins nach der Dialyse irreversibel präzipitiert vorlag. Es waren Bedingungen zu finden, unter denen das Spaltgemisch auch im leicht sauren Milieu stabiler ist.

II 1 Bedingungen für eine schonende Hydrolyse der Dimethylmaleinyllysinamide

Vom FSS-Komplex war bekannt, daß er in Form seines Ammoniumsulfatniederschlages sehr stabil ist. In dieser Form kann das Enzym über Monate ohne Aktivitätsverlust gelagert werden. Auch im Sauern wird FSS als Salzniederschlag nicht irreversibel geschädigt, es dissoziiert lediglich das Coenzym FMN ab. Dieses Verhalten wird allgemein zur reversiblen Abtrennung der Coenzyme von Flavinenzymen ausgenutzt (63). Vogel (64) hatte schonende Bedingungen hierfür ausgearbeitet, die in abgeänderter Form für die Hydrolyse der Dimethylmaleinylamide angewendet wurden. Hierbei legt man das Spaltgemisch bei pH 8,1 stark gepuffert vor und bringt die Lösung durch Zugabe von gesättigter Ammoniumhydrogensulfatlösung pH 2,0 vorsichtig auf pH 4,6. Die Bedingungen sind so gewählt, daß das Protein durch den Aussalzeffekt des Ammoniumsulfats bereits als Präzipitat vorliegt, bevor der pH-Wert etwa 7 unterschreitet. Die Hydrolyse geschieht also am präzipitierten Protein, das abzentrifugiert und dann in einem geeigneten Reaktivierungspuffer wieder aufgenommen werden kann. Daß die Hydrolyse solcher Amide an Proteinpräzipitaten möglich ist, konnten auch andere Autoren für den Fall von Citraconyl-Proteinen zeigen (131).

Die Reaktivierung der Teilreaktionen ist dann, ähnlich wie für die LiCl-Spaltung beschrieben, stark temperaturabhängig. Die Ansätze können über Stunden im Eisbad ohne nennenswerte Reaktivierung der Gesamtreaktion aufbewahrt werden.

II 2 Verhalten der Gesamtreaktion bei der Reaktivierung

In Abb. 8A ist das Reaktivierungsverhalten der Gesamtreaktion in Abhängigkeit von der Zeit gezeigt. Der Protein-niederschlag nach saurer Ammoniumsulfatpräzipitation wurde in einem Phosphatpuffer pH 7,5 aufgenommen, der FMN und freies

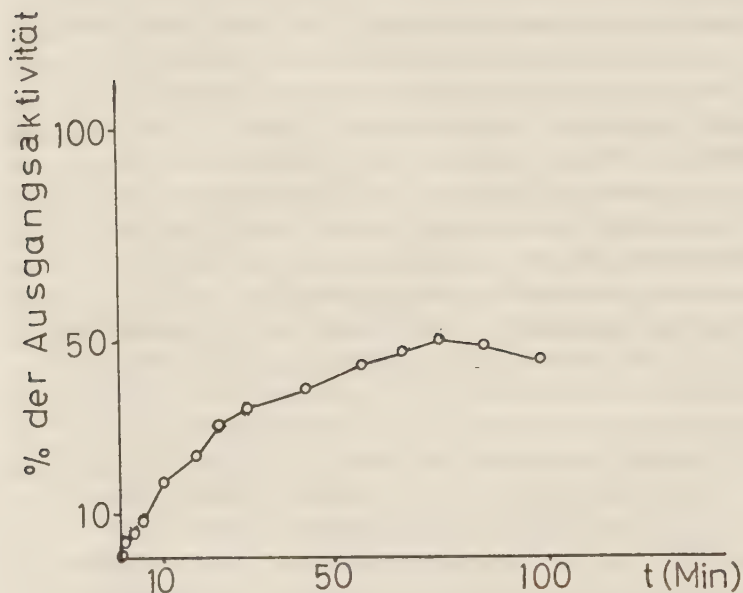


Abb. 8A : Zeitabhängigkeit der Reaktivierung zur Gesamtreaktion

FSS-DMMA-Standardspaltansatz wurde mit 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, 1mM DTT äquilibriert, 1:1 mit 2 M Tris/Ac-Puffer versetzt (pH 8,1), und der sauren Ammoniumsulfat-Behandlung unterworfen. Anschließend wurde zentrifugiert, der Niederschlag in Reaktivierungspuffer aufgenommen, und der Ansatz an Sephadex G 50 in Reaktivierungspuffer chromatographiert (alle Vorgänge bei 0-4 °C). Hierauf erfolgte der Start der Reaktivierung durch Inkubation bei 25 °C. Zu den genannten Zeitpunkten wurden dem Ansatz Aliquote entnommen, in denen die Aktivität der Gesamtreaktion bestimmt wurde.

Thiol enthielt (Einzelheiten im Experimentellen Teil). Wurde bei einer Proteinkonzentration von 1 - 3 mg mg/ml bei 25°C inkubiert und zu den in Abb. 8 angegebenen Zeitpunkten gemessen, ergaben sich sehr schlechte Aktivitätsausbeuten. Nach Entfernen von Salzresten im wiederaufgelösten Niederschlag durch Gelfiltration ergaben sich die gezeigten Werte. Relativ kleine Mengen an Ammoniumsulfat hatten also die Reaktivierung gestört. Die bisher maximale Reaktivierungsausbeute betrug 50 %. bezogen auf die ursprünglich vorhandene Gesamtaktivität und um 60 %, wenn die Werte mit FSS verglichen werden, die zwar nicht chemisch modifiziert, aber der Ammoniumhydrogensulfatbehandlung unterworfen worden war. (Die Ammoniumhydrogensulfatbehandlung nativer FSS erlaubte eine Reaktivierung von 80 % der Ausgangsaktivität.) Diese Werte sind in Tab. 4 noch einmal zusammengestellt:

Tabelle 4

REAKTIVIERUNGS-AUSBEUTEN DER GESAMTREAKTION

FSS SAUER GEFÄLLT BEZOGEN AUF FSS NATIV	80 %
FSS DMMA BEZOGEN AUF FSS NATIV	50 %
FSS DMMA BEZOGEN AUF FSS SAUER GEFÄLLT	62,5%

II 3 Analytik zur Reaktivierung

Diese nicht vollständige Reaktivierung warf die Frage auf, ob die Untereinheiten nicht vollständig und einheitlich zum Komplex zusammentraten, oder ob ein nicht ganz intakter Komplex entstanden war, oder ob ein nach physikalischen

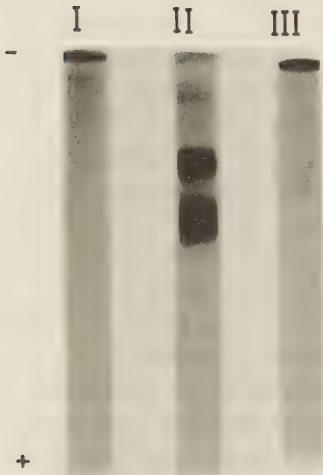


Abb. 9

Analytische Diskgelelektrophoresen
System Maurer 1 (52), von:

I: FSS nativ (30 µg),

II: FSS-DMMA-Spaltansatz
(30 µg) und

III: FSS-DMMA-Spaltansatz,
nach saurer Fällung und
Reaktivierung (~30 µg).

Durchführung s. exp. Teil.
(5 %ige Gele).

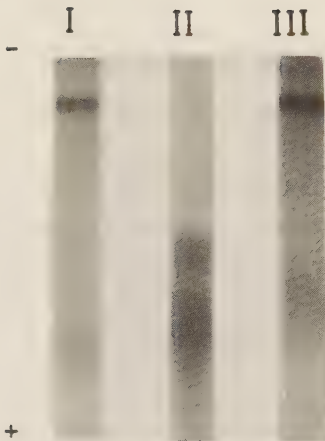


Abb. 9 a

Analytische Diskgelelektrophoresen
wie in Abb. 9, jedoch waren die
Gele 3.4 %ig an Acrylamid.

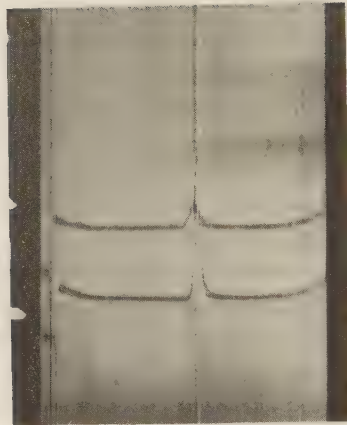
Kriterien mit nativer FSS identischer, jedoch wenig aktiver Komplex entstanden war.

Um dies zu entscheiden, wurde das reaktivierte Protein auf der "nativen"⁺⁾ Disk-Gelelektrophorese untersucht und verglichen mit unbehandeltem Komplex. Abb. 9 zeigt das Ergebnis eines solchen Elektrophoreselaufs. Man erkennt, daß sich das reaktivierte Protein (Abb. 9 III) ebenso verhält wie native FSS (I). Gel II zeigt den Spaltansatz, der zur Reaktivierung eingesetzt war. Da für diesen Versuch Gele mit einer Acrylamidkonzentration von 5 % benützt worden waren, um eventuell noch vorhandene Untereinheiten gut sichtbar zu machen, läßt sich auch nicht annähernd sagen, daß es sich bei der Probe auf Gel III um ein Aggregat vom Molekulargewicht um $2,3 \times 10^6$ handelt. Auch kleinere Proteine bis herab zu einem Molekulargewicht um eine Million würden nicht in ein solches Gel einwandern (52,65). Deshalb wurde das Reaktivat auch auf 3,4 %igen Gelen untersucht, auf denen zwar die Untereinheiten nur unscharf erscheinen, der native Komplex jedoch einzudringen vermag. Abb. 9a zeigt, daß in diesem System reaktiviertes Protein und nativer Komplex identisch wandern.

Als weiteres Kriterium für die Reaggregation wurde das Sedimentationsverhalten von nativem Protein und Reaggregat im Schwerfeld der analytischen Ultrazentrifuge untersucht. Abb. 10 zeigt einen "wedge"-Lauf von nativer FSS gegen einen reaktivierten Spaltansatz, der 50 % der Ausgangsaktivität aufwies. Beide Proteinproben lagen im gleichen Puffer vor. Da beide Proteine identisch wanderten und für FSS nativ eine Sedimentationskonstante von 40 S beschrieben ist (5,92), darf man schließen, daß FSS, die durch Behandlung mit DMMA quantitativ in ihre Untereinheiten dissoziiert worden war, tatsächlich zum vollen Komplex mit 40 S reaggregiert.

Die Analytik mit der Disk-Gelelektrophorese und der analytischen Ultrazentrifuge zeigt also, daß die nur 50 %ige

+) (s. exp. Teil, D 4 a)



SEDIMENTATION

Abb. 10

Analytische Ultrazentrifugation von FSS nativ (unten: Normal-Zelle) und FSS-DMMA-Spaltansatz nach saurer Fällung und Reaktivierung (oben, wedge-Zelle). FSS nativ (5 mg/ml und FSS-reaktiviert (4 mg/ml) in 0.1 M K-Phosphat-Puffer, pH 7.5, 10 mM DTT, 0.5 mM K-EDTA, 10 μ M FMN. Aufnahme 9 Min. nach Erreichen der Höchstgeschwindigkeit, Lauf s. Abb. 6 a.

Reaktivierung nicht auf eine unkomplette Reassoziaton der Untereinheiten zurückzuführen ist, sondern daß, zumindest nach den angewendeten physikalischen Kriterien, quantitativ wieder ein Komplex mit einem Molekulargewicht von etwa 2,3 Mio. entstanden war.

II 4 Reaktivierungsverhalten einiger Teilreaktionen

Mit dem Reaktivierungsverhalten der Gesamtreaktion wurde nun die Reaktivierung einiger Teilreaktionen verglichen, besonders, um die für die Reaktivierung der Gesamtreaktion limitierenden Teilreaktionen zu finden. Tab. 5 zeigt die Ausbeuten der Reaktivierung einiger Teilreaktionen, angegeben in Prozent ihrer spezifischen Aktivitäten im nativen Komplex unter identischen Meßbedingungen. Die Kurven in Abb. 11 geben das Reaktivierungsverhalten dieser Teilenzyme in Abhängigkeit von der Zeit wieder. Von den beiden nach Spaltung auf Null abgesunkenen Aktivitäten der 3-Ketoacylreduktase und des kondensierenden Enzyms reaktiviert die Kondensationsreaktion langsamer und im Zeitverlauf recht ähnlich der Gesamtreaktion. Dieses Ergebnis ist ähnlich dem Verhalten des Enzyms nach LiCl-Spaltung und zeigt, daß die kondensierende Aktivität für die Geschwindigkeit der Gesamtreaktionsreaktivierung limitierend ist. Vergleicht man das Ausmaß der Reaktivierung der Gesamtreaktion mit dem der Teilreaktion, zeigt sich, daß die Kondensationsreaktion auch die Gesamtreaktionsausbeute limitiert (vgl. Tab. 5).

Bei dem in Abb. 11 dargestellten Versuch war die Reaktivierung der Gesamtreaktion nicht optimal, jedoch werden diese Werte gezeigt, da alle aufgeführten Messungen mit dem gleichen Reaktivierungsansatz ausgeführt sind und deshalb direkt miteinander verglichen werden können.

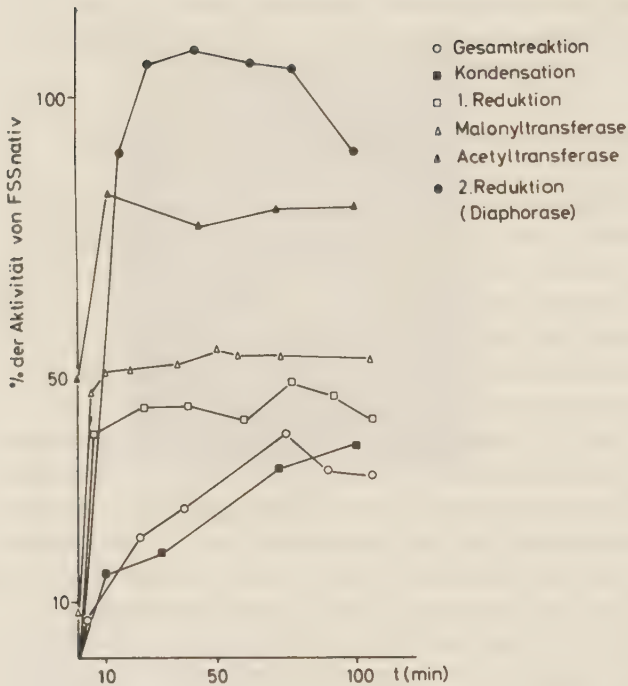


Abb. 11

Zeitabhängigkeit der Reaktivierung von Teilaktivitäten der FSS nach DMMA-Behandlung und saurer Fällung. FSS wurde nach DMMA-Standardspaltung mit 0.1 M Tris/HCl pH 8.0, 1 mM DTT, äquilibriert und nach Stehenlassen für 30 Min. bei 0°C sauer gefällt, zentrifugiert und der Niederschlag in Reaktivierungs-Puffer aufgenommen (Ausführung s. exp. Teil). Die Proteinlösung wurde durch Gelfiltration im Kalten von Resten an Ammoniumsulfat befreit, bei 25°C inkubiert (1,3 mg/ml) und zu den bezeichneten Zeitpunkten die Aktivität der aufgeführten Reaktionen mit den im exp. Teil beschriebenen Verfahren bestimmt.

Tabelle 5

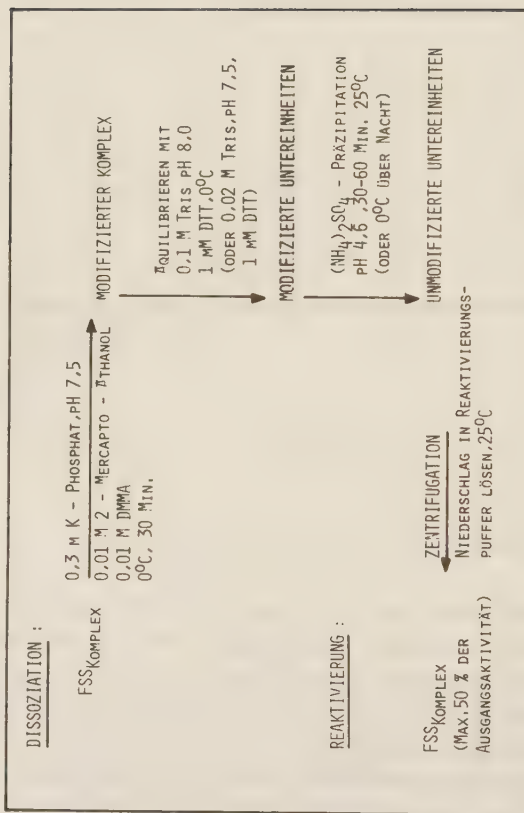
REAKTIVIERUNGS-AUSBEUTEN VERSCHIEDENER TEILREAKTIONEN

TEILREAKTIONEN	% BEZOGEN AUF NAT.FSS	% BEZOGEN AUF FSS SAUER GEF.	FSS SAUER GEFÄLLT
ACETYLTRANSFERASE	83	90	92
MALONYLTRANSFERASE	55	60	91
Δ^2 -ENOYLREDUKTASE	~ 110	--	--
DEHYDRATASE	100	--	--
β -KETOACYLREDUKTASE	49	68	72
β -KETOACYLSYNTASE	38	--	--
GESAMTREAKTION	40	50	80

Zusammenfassende Diskussion zu den Kapiteln I und II

Abb. 12 faßt die Schritte, die zu einer quantitativen Dissoziation und Reaktivierung der FSS führen, noch einmal schematisch zusammen. Auffällig ist die Tatsache, daß nach Acylierung von ca. 30 % aller freien Aminogruppen das Enz in der analytischen Ultrazentrifuge immer noch in Form des Komplexes sedimentiert, nur sein Zusammenhalt schwächer geworden ist, da ein Herabsetzen der Ionenstärke nun zur quantitativen Dissoziation in seine Untereinheiten führt. Dabei erfolgt auch Abspaltung eines Hauptteils des Co-enzym^s FMN. Die nicht kovalenten Bindungskräfte im Komplex müssen daher recht groß sein, was vermuten läßt, daß die übergeordnete Struktur für die Funktion des Enzyms

ABB. 12 : SCHEMA DES VORGEHENS BEI REVERSIBLER DISSOZIATION DER FSS



eine entscheidende Rolle spielen könnte. Betrachtet man jedoch die Fettsäuresynthetasen aus höheren Organismen, etwa aus Lebern, fällt auf, daß eine solche übergeordnete Struktur, in der mehrere Kopien der Untereinheitentypen zusammenge- lagert sind, nicht aufrecht erhalten ist. FSS aus diesen Organismen werden als einfache α, β -Dimere be- schrieben (43,44,66). Sie unterscheiden sich jedoch auch in anderer Hinsicht vom Hefe-Komplex; so besitzen sie ein Palmityldeacylase-Enzym, und sie benötigen zur Reduktion des Enoylrests während der Synthese nicht das Coenzym FMN (67).

Die Untereinheiten scheinen, wie das native Enzym, in Form ihres Ammoniumsulfatpräzipitats am stabilsten zu sein, die saure Hydrolyse der Dimethylmaleinamide erfolgt schonend am präzipitierten Protein.

Eine Reaktivierung des dissoziierten Komplexes zu mehr als 50 % der Ausgangsaktivität gelang bisher nicht, obwohl nachgewiesen wurde, daß die reaktivierte Spezies als ein- heitliches Protein mit einer Sedimentationskonstante von 40 S in der analytischen Ultrazentrifuge wandert und sich auch bei der Diskelektrophorese wie native FSS verhält. Man kann hier nicht ausschließen, daß trotz Anwesenheit von 2-Mercaptoäthanol in den Spaltansätzen reaktive Sulfhy- drylgruppen alkyliert worden waren, wie es von Gibbons und Perham für den Fall der Aldolase bei Behandlung mit CA beschrieben wurde (45). Eine Steigerung der 2-Mercapto- äthanolkonzentration in solchen Spaltinkubationen auf 50 mM hatte bei unseren Reaktivierungsversuchen die Aus- beuten jedoch nicht verbessert.

Die Tatsache, daß bei der Reaktivierung ausschließlich eine 40 S-Spezies entsteht, zeigt, daß die Komplexform der FSS unter den angewendeten Bedingungen thermodynamisch be- günstigt ist; andere Aggregate oder Untereinheiten traten nicht auf. Es sei erwähnt, daß dieses Ergebnis im Wider- spruch zu Angaben von Porter und Mitarbeitern steht. Sie

beschreiben unter Bedingungen, die unseren Reaktivierungsbedingungen recht ähnlich sind, eine 14 S-Spezies auch der Hefe-FSS, ein α, β -Dimeres analog den tierischen FSS (44). Dieses sei fähig, die Gesamtreaktion der Fettsäurebiosynthese auszuführen. Gründe, die im Verlauf dieser Arbeit beschrieben werden, geben jedoch weiteren Anlaß, an den von dieser Gruppe bezüglich der Hefe-FSS beschriebenen Daten zu zweifeln.

III Entwicklung eines analytischen Gel-Elektrophorese-systems zur Trennung von Proteinen ähnlicher Molekulargewichte

Schweizer konnte seine Ergebnisse aus den genetischen Untersuchungen bezüglich der Multifunktionalität der FSS-Untereinheiten für das Polypeptid α selbst und zusammen mit Kresze nachweisen, und zwar durch in vivo-Einbau von radioaktiver Pantothersäure und durch in vitro-Einbau eines radioaktiven Carboxamidomethylrests in diese Kette (22,59).

Um nun auch andere Teilfunktionen proteinchemisch den Polypeptidketten zuordnen zu können, beabsichtigten wir, die aktiven Zentren der Acetyl-, Malonyl- und Palmityltransferase mit ihren entsprechenden radioaktiv markierten Substraten zu beladen und die Untereinheiten nach Denaturieren des Komplexes analytisch aufzutrennen: So sollte über den Einbau von Radioaktivität eine Aussage zu treffen sein über die Verteilung der jeweiligen aktiven Zentren auf die Untereinheiten α und β .

Für die Versuche schien uns zur Auftrennung der Untereinheiten die von Schweizer beschriebene SDS-Gelelektrophorese (22,69,70) nicht geeignet zu sein, weil

1. die zu geringe Auftrennung der Proteine kein zuverlässiges Isolieren der getrennten Proben erlaubte, und

2. die Laufzeiten dieses Systems mit ca. 12 Stunden zu lang erschienen, da es sich bei den Produkten der Beladung mit den radioaktiven Substraten um relativ labile Ester handeln konnte.

Deshalb wurde zusammen mit H. Engeser aus unserem Labor ein Gel-Elektrophoresesystem entwickelt, das eine schnelle und zum Isolieren der Proteine genügend weite Auftrennung von denaturierter FSS erlaubt. Das in den vorigen Kapiteln beschriebene native Gelsystem, auf dem die Auftrennung der schonend acylierten FSS möglich ist, war für diese Problemstellung nicht geeignet, da FSS unter diesen Bedingungen eine zwar schwache Malonyl- und Palmityl-, aber eine starke Acetyldeacylasereaktion ausübt.

Versuche zur Denaturierung der FSS mit Reagentien wie Harnstoff und GuHCl hatten ergeben, daß das Protein nach ihrer Einwirkung nicht in löslicher Form in einen detergentienfreien Puffer überführt werden konnte (vgl. auch Vorbemerkung). Auch waren Gelelektrophoresen in Gegenwart von Harnstoff gescheitert, da kein Protein in die Gele einwanderte, sondern die Proben quantitativ am Start liegenblieben.

Unsere Experimente mit der chemischen Modifizierung hatten jedoch ergeben, daß die resultierenden Proben gut löslich waren und auch in harnstoffhaltige Gele einwandern konnten, wengleich sie verschmierte Banden erzeugten. Diese bessere Löslichkeit war zurückzuführen auf das Vorhandensein zusätzlicher negativer Ladungen in den Proteinen.

Eine Kombination von erschöpfender Acylierung aller freien Amine in den Proben und anschließender Gelelektrophorese in der Gegenwart von Harnstoff bot nun zwei Vorteile:

1. Die Proteine waren nach erschöpfender Acylierung löslich genug, um ohne jeden Startausfall als scharfe Banden in harnstoffhaltige Gele einzuwandern, und

2. der Verzicht auf die Gegenwart des ionischen Detergens SDS im Elektrophoresesystem erlaubte die Anwendung weit höherer Feldstärken als in der SDS-Gelelektrophorese. Es ergaben sich Strom-Spannungsverhältnisse, wie sie in der nativen Disk-Gelelektrophorese zur Anwendung kommen. Hierdurch konnten die Trennzeiten auf ein bis zwei Stunden reduziert werden (gegenüber 8 bis 12 Stunden in der SDS-Gelelektrophorese).

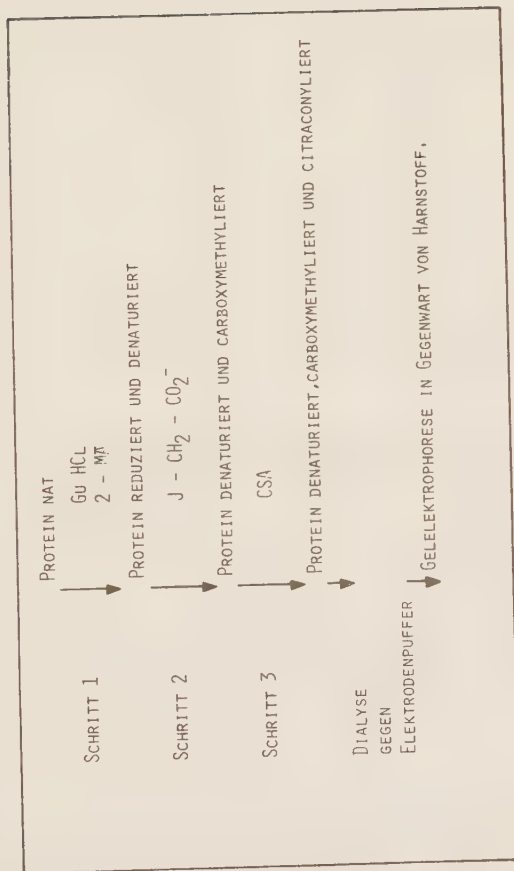
Das Vorgehen bei der Kombination der chemischen Modifizierung mit der Harnstoff-Gelelektrophorese ist in Abb. 13 schematisch zusammengefaßt (Einzelheiten sind im experimentellen Teil beschrieben).

Um eine spätere intermolekulare Disulfidbildung und eine unspezifische Alkylierung von SH-Gruppen in den Proben zu vermeiden, wurden die Proteine nach Denaturieren mit GuHCl vollständig reduziert und anschließend carboxymethyliert. Hierauf wurden die freien Aminogruppen der Proben erschöpfend citraconyliert. (Wegen der höheren Stabilität seiner Amide wurde dem CA gegenüber DMMA der Vorzug gegeben (vgl. Tab. 1)). Alle Reaktionen wurden im selben Reagenzglas durchgeführt. Um die bei der Gelelektrophorese störenden überschüssigen Reagentien zu entfernen, wurden die Proben gegen den Elektrodenpuffer des verwendeten Gel-Elektrophoresesystems dialysiert. Darauf erfolgte die Elektrophorese in Gegenwart von Harnstoff.

Abb. 14 zeigt eine TNBS-Titration freier Aminogruppen in nativer FSS (Kurve I) und nach erschöpfender Citraconylierung (Kurve II). Nach der beschriebenen Behandlung waren keine freien Aminogruppen mehr nachweisbar.

Die vollständige Carboxymethylierung wurde wie folgt nachgewiesen: Ein Aliquot der Modifizierungsansätze wurde nach Schritt 2 in Abb. 13 durch Gelchromatographie von

Abb. 13 : Schema des Vorgehens bei der erschöpfenden chemischen Modifizierung



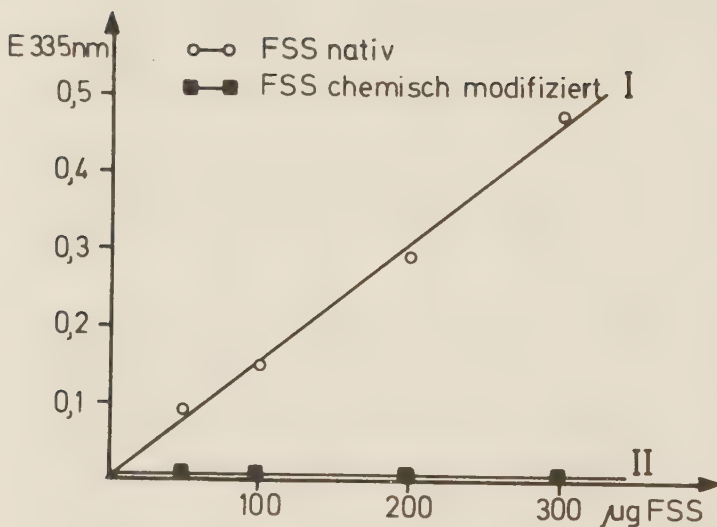


Abb. 14

Bestimmung freier Aminogruppen der FSS vor und nach Citraconylierung mit TNBS nach (60). I: FSS nativ in 0.05 M K-Phosphat, pH 8.5. II: FSS wurde mit GuHCl denaturiert, reduziert, carboxymethyliert und citraconyliert, wie im exp. Teil beschrieben. Darauf wurde ein Aliquot des Ansatzes durch Chromatographie an Sephadex-G50 in 0.05 M K-Phosphat, pH 8.5 von niedermolekularem Material befreit und zur Bestimmung freier Aminogruppen eingesetzt. (Durchführung s. exp. Teil).

überschüssigem freien Thiol befreit, anschließend mit Ellman's Reagens versetzt und die optische Dichte bei 405 nm bestimmt (49). (Einzelheiten sind im experimentellen Teil beschrieben.) Es fand keine Farbentwicklung statt, die Proteinthiole lagen also quantitativ alkyliert vor. Dies bedeutet, daß keine künstlich bewirkte Heterogenität durch unvollständige Acylierung bzw. Carboxymethylierung, und damit Artefakte auf der Gelelektrophorese befürchtet werden mußten.

Abb. 15 zeigt die analytische Gelelektrophorese einer FSS-Probe, die wie beschrieben, vorbehandelt worden war. Man erkennt zwei Hauptbanden und eine schwache, etwas schneller wandernde Bande. Um zu entscheiden, welche der Banden nun welche Polypeptidkette darstellte, bedienten wir uns der in Kapitel I bereits erklärten spezifischen Markierung der Kette α mit radioaktivem Jodacetamid (JAM). Mit ^{14}C -JAM carboxamidomethylierte FSS, die von überschüssigem JAM befreit war, wurde der Behandlung analog dem Schema in Abb. 13 unterworfen. Nach Elektrophorese und Anfärben der Gele wurden diese in einem Gel-Scanner bei 550 nm vermessen (s. Abb. 16 unten) und dann in gleich dicke Scheibchen zerschnitten. Diese Fraktionen wurden im Szintillationszähler ausgemessen. Die Balken in der Abb. 16 oben geben die Verteilung der Radioaktivität an und zeigen, daß der Carboxamidomethylrest ausschließlich in die schneller wandernden Proteinbanden eingebaut war: Bande I enthielt überhaupt keine Radioaktivität. Dies bedeutet, daß es sich bei den Banden II und III um α und α' (ein von Schweizer beschriebenes proteolytisches Abbauprodukt aus α (22)) handeln mußte. Folglich stellte die langsamere wandernde Bande die Untereinheit β dar.

Damit lag ein Elektrophoresesystem vor, mit dem Lokalisationsstudien bezüglich der Transferasen der FSS durchgeführt werden konnten.

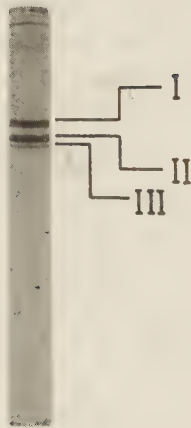


Abb. 15

Analytische Gelelektrophorese von carboxymethylierter und citrconylierter FSS in Gegenwart von Harnstoff. Gel: 3.4 %ig an Acrylamid, 6 M Harnstoff, System Maurer 1 (52), Lauf 110 Min. bei 280 V (stabilisiert) und 4°C (andere Einzelheiten s. exp. Teil). Aufgetragen waren ca. 10 µg Protein.

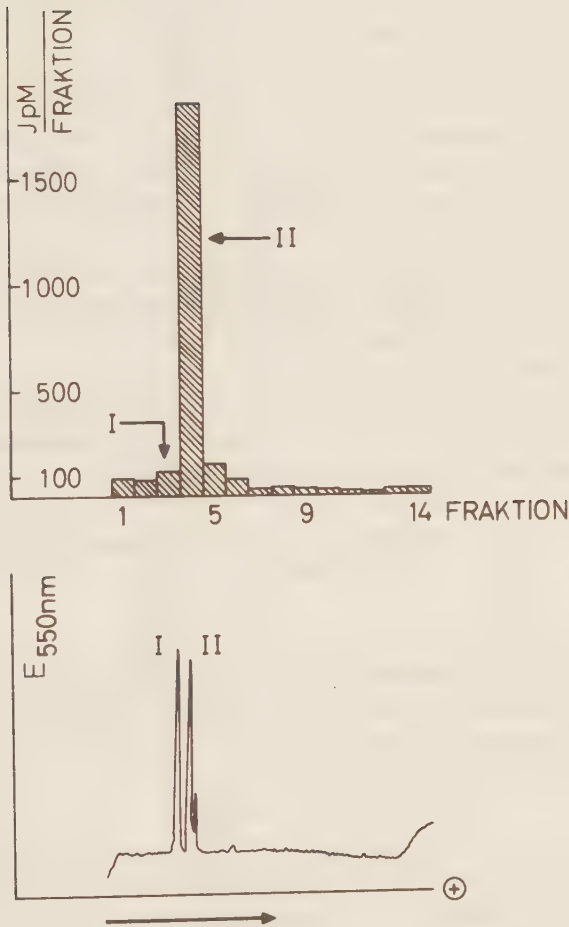


Abb. 16 Analytische Gelelektrophorese von α - ^{14}C -CAM-FSS nach erschöpfender Carboxymethylierung und Citraconylierung. FSS, nach (57) in Untereinheit α mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Jam carboxamidomethyliert (s. exp. Teil), wurde denaturiert, carboxymethyliert und citraconyliert, nach Dialyse der Gelelektrophorese in Gegenwart von 6 M Harnstoff unterworfen, angefärbt und entfärbt, in 14 gleich dicke Scheiben zerschnitten und nach Inkubation mit Soluene 350 die Radioaktivität in den Fraktionen bestimmt. Aufgetragen waren ca. 18 μg Protein, Gel 3,4 %ig an Acrylamid, System Maurer 1 (52), Ausführung siehe exp. Teil.

III 1 Proteinchemische Lokalisierung der Acetyl-, Malonyl- und Palmityltransferase (71)

Frühere peptidchemische Untersuchungen im Lynen'schen Labor hatten ergeben, daß es sich bei den Transferasen der FSS um Serin-Enzyme handelt (72 - 76). Will man diese aktiven Zentren spezifisch mit den entsprechenden Substraten beladen, muß man eine Weiterübertragung dieser Säurereste auf die Enzymthiolgruppen verhindern. Dazu wurde in der Vergangenheit wiederholt die Reaktion von freien Thiolen mit Ellman's Reagens benützt (19,72,78). Eine zweistündige Inkubation der FSS mit 10^{-3} M DTNB bei 0°C führt zur Blockierung aller aktiven Sulfhydryle des Enzyms, ohne die Komplexstruktur deutlich zu schädigen (19). Freisetzungsversuche haben gezeigt, daß die Transferasen des Komplexes nach einer solchen Behandlung noch aktiv sind (78). Ebenso sind sie noch aktiv, wenn man die essentiellen Thiole mit N-Äthylmaleimid (NEM) blockiert (72).

In Abwandlung des Schemas in Abb. 13 wurde zur Beladung der FSS mit den oben genannten ^{14}C -markierten Substraten und anschließender erschöpfender Modifizierung wie folgt verfahren:

FSS wurde mit DTNB vorinkubiert und dann jeweils ein Ansatz mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA, $3\text{-}^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA bzw. $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Palmityl-CoA versetzt. (Einzelheiten sind im experimentellen Teil beschrieben.) Durch Reaktion des freierwerdenden CoA-SH mit überschüssigem DTNB wird das Gleichgewicht zugunsten der FSS-Substratverbindung verschoben. Die Proben wurden mit GuHCl denaturiert und dann citraconyliert. Nun erfolgte die Reduktion der blockierten Sulfhydrylgruppen, die dann alkyliert wurden. (Schritt 3 in Abb. 13 vor Schritt 2.) Nach Dialyse wurden die Proben der Gelelektrophorese unterworfen, die Gele angefärbt, fraktioniert und die Radioaktivität in den Scheibchen bestimmt.

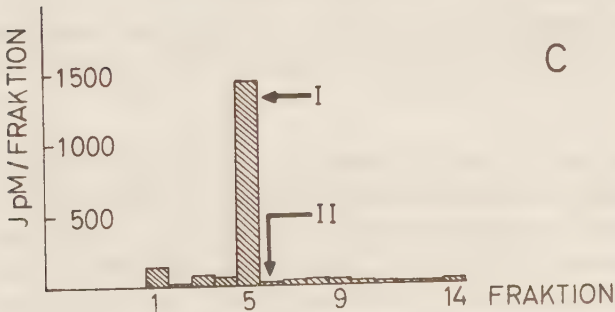
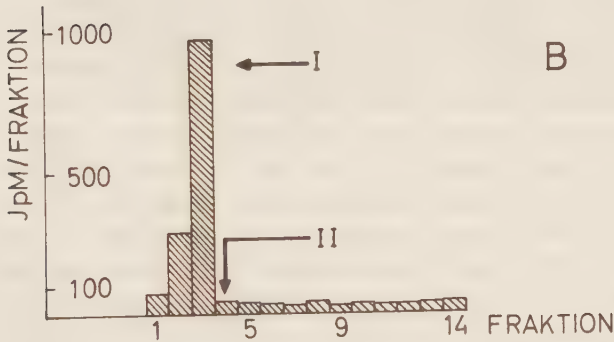
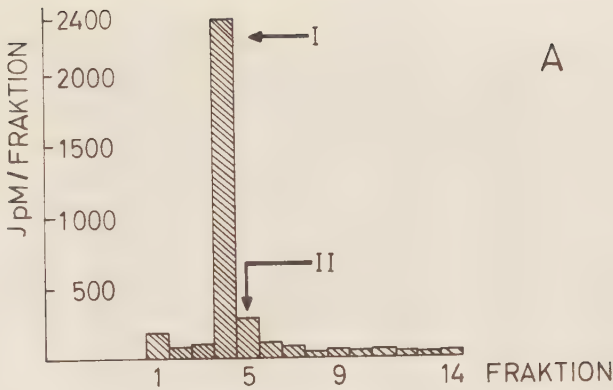


Abb. 17

Verteilung der Radioaktivität in den Untereinheiten der FSS nach Beladung des Komplexes mit radioaktiven Substraten und Auftrennung in der Harnstoff-Gelelektrophorese nach erschöpfender Carboxymethylierung und Citraconylierung (Beladung und Durchführung der Elektrophoresen s. exp. Teil).

A: ^{14}C -Acetyl-FSS

B: ^{14}C -Malonyl-FSS

C: ^{14}C -Palmityl-FSS

Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abb. 17 zusammengestellt. Die Radioaktivität von Acetat (Abb. 16 (A)), von Malonat (B) und von Palmitat (C) fand sich in der langsamer wandernden Bande I wieder. Alle drei Transferasen des Komplexes liegen also auf seiner Untereinheit β . Ein Kontrollversuch mit spezifisch in α radioaktiv markierter FSS hatte ergeben, daß das elektro-phoretische Verhalten der Polypeptide durch das gegenüber dem Schema in Abb. 13 geänderte Vorgehen nicht beeinflusst wurde.

Das Ergebnis dieser Versuche ist in Übereinstimmung mit der Lokalisierung der Malonyl- und Palmityltransferase, wie sie von Schweizer auf Grund seiner genetischen Untersuchungen vorgeschlagen wurde und zeigt, daß auch die Acetyltransferasereaktion von der β -Untereinheit katalysiert wird. Inzwischen wurde die Acetyltransferase auch auf genetischer Basis der β -Kette zugeordnet (42). Die Ergebnisse widersprechen zudem nicht der Annahme, daß die Malonyl- und die Palmityltransferase ihr aktives Zentrum teilen (77-79).

III 2 Anwendung der Kombination erschöpfender chemischer Modifizierung mit der Harnstoff-Gelelektrophorese auf andere Proteine

Die in Kapitel III beschriebene Auftrennung der FSS warf die Frage auf, ob das verwendete Kombinationssystem von Modifizierung und Harnstoff-Gelelektrophorese nicht eine mehr allgemeine Anwendung in der Analytik von Proteingemischen finden könnte. Aus diesem Grund wurden verschiedene Proteine mit dieser Methode untersucht. Es handelt sich dabei um folgende Gruppen:

Als Vertreter großer Polypeptide mit hohen Molekulargewichten wurden neben den FSS-Untereinheiten 6-Methylsalicylsäuresynthetase aus *Penicillium Patulum* (6-MSS),

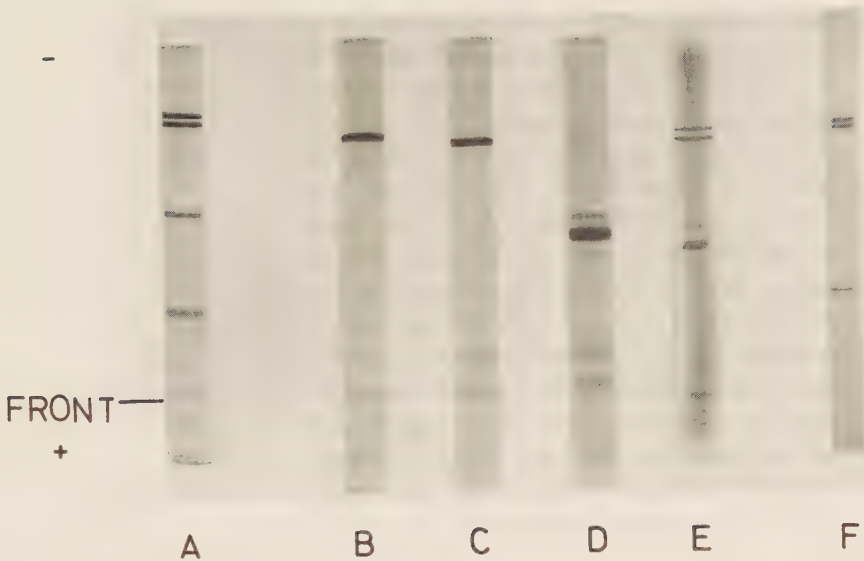


Abb. 18

Analytische Gelelektrophoresen von RNS-Polymerase und ihren isolierten Untereinheiten β' , β und σ : Die Proben wurden denaturiert, reduziert, carboxymethyliert und citraconyliert, wie im exp. Teil beschrieben (vgl. auch Abb. 13). Anschließend erfolgte Elektrophorese auf 3.4 %igen Gelen, 6 M Harnstoff. Aufgetragen wurden jeweils zwischen 10 und 20 μ g Protein, auf Gel

- A: RNS-Polymerase, Gesamtzym
- B: Untereinheit β'
- C: Untereinheit β
- D: Untereinheit σ (die freundlicherweise von Herrn Rexer zur Verfügung gestellt wurde)
- E: die Untereinheiten β' , β und σ gemischt.

(Elektrophoresebedingungen s. exp. Teil.)

- F: SDS-Gradientengelelektrophorese, System Laemmli (80), 5-15 % Acrylamid, freundlicherweise von Professor Dr. Zillig zur Verfügung gestellt.

Acetyl-CoA-Carboxylase aus Hefe und RNS-Polymerase aus E.coli und deren isolierte Untereinheiten β , β' und σ untersucht.⁺⁾ Abb. 18 zeigt die Auftrennung von RNS-Polymerase (Gel A), ihre Untereinheiten β' (Gel B) und β (Gel C) und σ (Gel D). Gel E enthält eine Probe bestehend aus einer Mischung von β' , β und σ . Diese Auftrennung wird verglichen mit dem Muster von Gesamt-Polymerase, wie es von Professor Zillig auf einem SDS-Gradienten-Gel erhalten und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde (Gel F). Aus dem Vergleich geht hervor, daß das relative Wanderungsverhalten der Untereinheiten zueinander in beiden Methoden gleich ist. Die Auftrennung der ähnlich großen Polypeptide β' und β (Molekulargewichte 160 000 und 155 000 (81)) war im homogenen 3,4 %igen Polyacrylamid-Gel durchaus vergleichbar mit der auf einem SDS-Gradienten-Gel erhaltenen.

Der Komplex Acetyl-CoA-Carboxylase aus Hefe enthält nur einen Untereinheitentyp (26) und zeigt nach Gelelektrophorese mit der beschriebenen Methode im wesentlichen eine Bande, ein Hinweis auf die Homogenität des modifizierten Proteins (Abb. 19 A). Von 6-MSS wird angenommen, daß auch hier nur ein Untereinheitentyp den Komplex aufbaut (82), und auch in diesem Fall konnte nur eine Proteinbande beobachtet werden (Abb. 19 B).

Um die Anwendbarkeit der Methode auf Proteine mit fibrillärer Struktur zu prüfen, wurden Typ I Kollagen des Huhns und Kälber-Typ III Kollagen untersucht (83).⁺⁺⁾ Wie in Abb. 20 A gezeigt, ergab Typ I Kollagen zwei schwach getrennte Banden II und III mit einem ungefähren Anfärbungsverhältnis 1:2, und eine dritte Zone, die viel langsamer gewandert war (I).

+) An dieser Stelle sei den Herren J. Friedrich, Dr. J. Spieß, Professor W. Zillig und Dr. P. Palm gedankt, die die genannten Enzyme (Reihenfolge wie oben) freundlicherweise zur Verfügung gestellt haben.

++) Die Kollagene wurden freundlicherweise von Dr. P. Müller zur Verfügung gestellt.

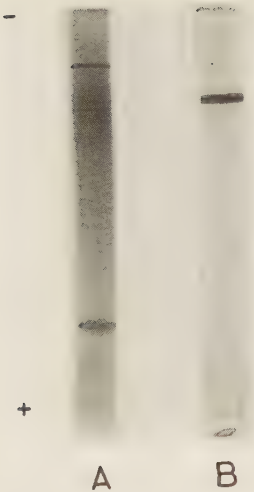


Abb. 19

Analytische Gelelektrophoresen von Acetyl-CoA-Carboxylase aus Hefe (A) und 6-Methylsalicylsäuresynthetase aus *Penicillium Patulum*. Vorbereitung der Proben und Durchführung wie in Abb. 18, jedoch waren die Gele 5 %ig an Acrylamid.

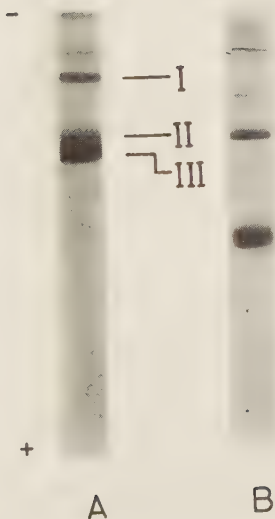


Abb. 20

Analytische Gelelektrophoresen von Typ I-Kollagen des Huhns (A) und Kälber-Typ III-Kollagen (B). Durchführung wie in Abb. 19 A (Abb. 18), Elektrophorese-dauer Gel A: ca. 100 Min., Gel B: ca. 150 Min.

Die Untereinheitenstruktur dieses Kollagens ist $(\alpha_1I)_2\alpha_2$, und es enthält kovalent verknüpfte Dimere und Trimere (132). Die Intensität der Banden läßt die Annahme zu, daß es sich bei der schnellstwandernden um α_1I handelt, das knapp von α_2 getrennt ist. Das viel langsamer wandernde Material könnte Dimere und Trimere darstellen. Typ III Kollagen (Abb. 20 B) zeigt in Übereinstimmung mit seiner Untereinheitenstruktur eine starke Hauptbande. Auch hier ist einiges oligomere Material zu beobachten, das viel langsamer wandert.

Da viele Komplexe aus Untereinheiten geringeren Molekulargewichts aufgebaut sind als die bisher untersuchten Proteine, sollte die Zuverlässigkeit dieser Methode auch für die Auftrennung kleinerer Proteine geprüft werden. Abb. 21 zeigt die Trennmuster von Kaninchenmuskelaldolase (A), menschlichem Fibrinogen und seinen Untereinheiten α , β und γ (B - F), Pyruvatdehydrogenase aus Rinderniere (G) und Schweine-Hämoglobin (H).^{+) Aldolase ist ein Tetrameres aus einer Untereinheit und zeigt eine Bande. Die Auflösung des Fibrinogens in die drei Hauptbanden I, II und III, die die Untereinheiten α , β und γ darstellen, wurde in Übereinstimmung mit der SDS-Gelelektrophorese gefunden (Abb. 21 L).^{+) Bande I zeigt eine leichte Heterogenität, die möglicherweise auf einen bekannten proteolytischen Abbau der α -Untereinheit zurückzuführen ist (84). Vergleicht man das Bandenmuster des Fibrinogens, wie es mit der beschriebenen Methode erhalten wurde, mit dem Muster auf der SDS-Gelelektrophorese, ergibt sich ein deutliches Merkmal der von ionischen Detergentien freien Elektrophorese: Die Banden erscheinen schärfer als auf SDS-Gelen.}}

^{+) Fibrinogen wurde dankenswerterweise von Frau Dr. Henschen und das Hämoglobin von Frau Dr. Kleinschmidt zur Verfügung gestellt. Pyruvatdehydrogenase war ein Geschenk von Dr. G. Kresze.}

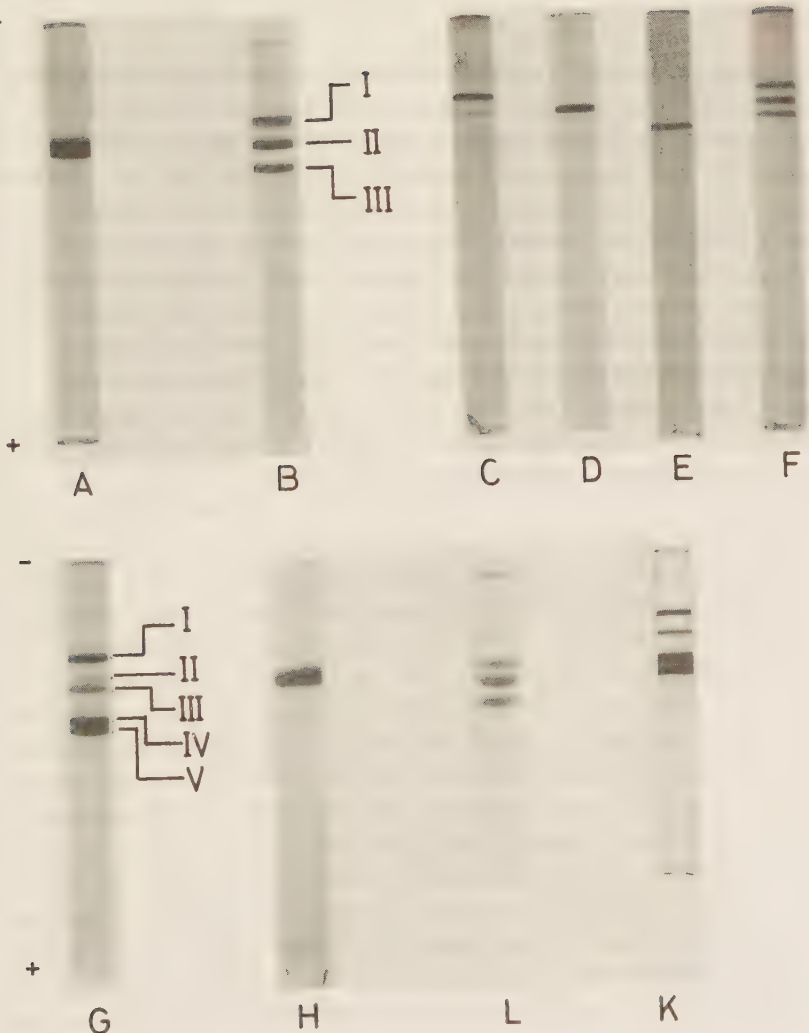


Abb. 21

Analytische Gelelektrophoresen von Aldolase (A), menschlichem Fibrinogen (B), dessen Untereinheiten α (C), β (D), γ (E), einer Mischung der Untereinheiten α , β und γ (F); Rindernieren-Pyruvatdehydrogenase (G) (Gele A-G: 7,5 %ig an Acrylamid); und Schweinehämoglobin (H) (Gel 10 %ig an Acrylamid). Durchführung siehe Abb. 18.

Gel L: SDS-Gelelektrophorese von reduziertem Fibrinogen (von Herrn Lodspeich freundlicherweise zur Verfügung gestellt).

Gel K: SDS-Gelelektrophorese von Rindernieren-Pyruvatdehydrogenase (Dr. Kresze).

Pyruvatdehydrogenase ergab ein Untereinheitenmuster ähnlich dem, wie es auch auf der SDS-Gelelektrophorese erscheint (Abb. 21 G), nämlich Transacetylase (I), Lipoyldehydrogenase (III) und die α - und β -Untereinheiten (IV und V). Die schwache Bande II könnte auf die Pyruvatdehydrogenase-Kinase zurückzuführen sein, von der man weiß, daß sie teilweise mit dem Komplex angereichert wird (31,85). Im Falle des Schweinehämoglobins wurde keine Auftrennung in seine beiden Untereinheiten erreicht. Die sehr ähnlichen Molekulargewichte dieser Untereinheiten α und β und die geringen Unterschiede ihres Gehalts an sauren Aminosäuren und an Lysin können dies erklären (86). Damit ist eine Grenze der Methode gezeigt.

Zusammenfassende Diskussion zu Kapitel III

Einige Merkmale der beschriebenen Methode seien zusammengefaßt:

1. Die Proteine werden homogen modifiziert, Artefakte waren nicht zu beobachten.
2. Hohe Feldstärken erlauben kurze Trennzeiten und damit eine Trennschärfe, die schonende Beladungsexperimente ermöglicht.
3. Die Proteinproben sind im denaturierten Zustand sehr gut löslich.

Die Wanderungsgeschwindigkeiten der denaturierten und modifizierten Proteine ist vor allem abhängig von ihrer Ladung und weniger von ihrem Molekulargewicht. Dies wird besonders deutlich im Fall der FSS, wo unter den beschriebenen Bedingungen die größere Untereinheit α schneller wandert als β . Der Fall, daß sich in einem Gemisch verschiedener Proteine die Ladungen nach der Behandlung so kompensieren, daß elektrophoretisch einheitliches Material entsteht, ist zwar möglich, jedoch unwahrscheinlich. Trotzdem scheint aus diesem Grund die Anwendung der kombinierten Methode nur sinnvoll, wenn zum Vergleich auch die SDS-Gelelektrophorese durchgeführt wird. Dann allerdings mag sie in manchen Fällen einer Verschärfung der Analytik von Proteinproben in Bezug auf deren Heterogenität dienen.

IV Präparative Isolierung der Untereinheiten α und β der FSS

Wie in den vorigen Kapiteln beschrieben, war bisher proteinchemisch die Lokalisierung des ACP (68) und des kondensierenden Enzyms (59) auf Untereinheit α und der drei Transferasen auf β (71) gelungen. Experimente dieser Art waren für die Zuordnung der Teilaktivitäten β -Ketoacylreduktase, Enoylreduktase und Dehydratase nicht möglich, weil die Substrate dieser Enzyme mit ihren aktiven Zentren keine kovalenten Bindungen eingehen. Um solche reaktiven Zentren zu lokalisieren, erschien nur die Messung ihrer enzymatischen Aktivität in den isolierten Untereinheiten geeignet. Die kondensierende Aktivität und die 1. Reduktase waren mit allen bisher angewendeten Spaltmethoden auf Null abgesunken (17,20,Kap.I). Die Aktivität dieser Reaktionen scheint von einer relativ hoch geordneten Proteinstruktur abzuhängen.

Sind die isolierten Untereinheiten α und β in der Lage, unter Reaktivierungsbedingungen mit sich selbst höhere Aggregate zu bilden, und genügen dann vielleicht solche Subkomplexe, um die erwähnten beiden Reaktionen zu katalysieren? Oder besteht zwischen den Untereinheiten verschiedenen Typs eine Kooperativität, die nötig ist, um diese Reaktionen zu ermöglichen? Um solche und andere Fragen zu klären, schien es notwendig, die Untereinheiten der FSS in einer Form zu isolieren, die eine Reaktivierung zum Komplex oder doch wenigstens die enzymatische Bestimmung von Teilaktivitäten in den isolierten Ketten zuließ.

IV 1 Versuche mit der präparativen Gelelektrophorese

Abb. 9 (Gel II) in Kapitel II zeigt FSS nach Dissoziation durch schonende chemische Modifizierung mit DMMA. Das

Spaltgemisch, das noch einige Teilaktivitäten aufweist, ist auf dem analytischen Gel gut genug aufgetrennt, um eine präparative Gelelektrophorese sinnvoll erscheinen zu lassen. Am günstigsten hierfür erwies sich eine Anordnung, die von Weithmann verwendet wurde (20). Es handelt sich um ein Polyacrylamid-Ringgel, das auf einen Rohrzuckergradienten aufgesetzt ist. Als Gefäß für diese Anordnung wurde eine Isokussiersäule der Firma LKB benutzt. Dies bietet zwei Vorteile:

1. Eine intensive Kühlung durch einen Kühlmantel und einen Kühlfinger.
2. Die getrennten Proteine wandern als recht stabile Zonen in den Rohrzuckergradienten ein und können durch Abzapfen des Gradienten bequem fraktioniert werden.

Als notwendige Ergänzung der von Weithmann vorgeschlagenen Anordnung stellte sich eine kontinuierliche Umwälzung der beiden Elektrodenpuffer heraus, die durch Elektrolyse sonst recht schnell sauer bzw. alkalisch wurden. Die Anordnung ist im experimentellen Teil beschrieben.

Wurde zu einer solchen Elektrophorese Spaltansatz eingesetzt, der in α mit ^{14}C -JAM radioaktiv beladen war, dann ergab sich nach Fraktionieren des Rohrzuckergradienten das in Abb. 22 dargestellte Elutionsprofil. Der Gipfel der Acetyltransferaseaktivität (Polypeptid β) erscheint deutlich getrennt vom Gipfel der Radioaktivität (α). Abb. 23 zeigt die Analytik einzelner Fraktionen auf der nativen Disk-Elektrophorese. Die Maxima des Acetyltransferase- und des Radioaktivitätsgipfels entsprachen recht homogenen Proteinbanden mit verschiedenem Wanderungsverhalten. Damit schien eine präparative Auftrennung der Untereinheiten gelungen. Es stellte sich jedoch heraus, daß die Ausbeuten mit dieser Methode für viele Zwecke, wie Aminosäureanalyse, Erzeugung von Antikörpern u.ä., zu gering war. Bestenfalls

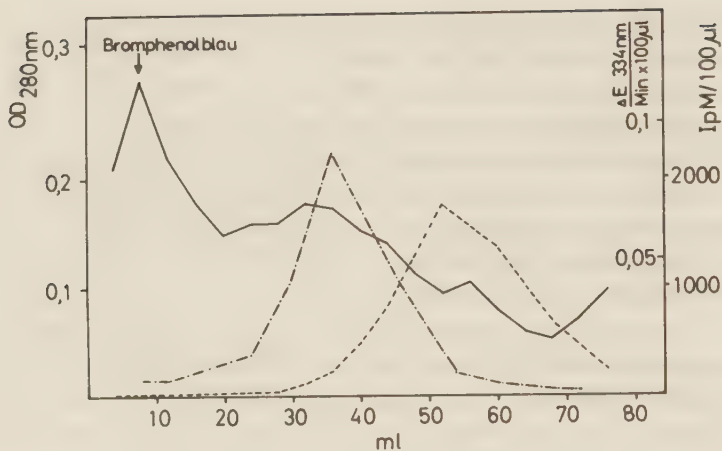


Abb. 22 Präparative Gelelektrophorese eines α -1-¹⁴C-CAM-FSS-CA-Standardspaltansatzes. Die Anordnung des Elektrophoresesystems ist im exp. Teil beschrieben. Aufgesetzt wurden 3.5 mg des radioaktiven Spaltansatzes, Laufzeit 18 Stunden bei 4°C und 160 V (stabilisiert); 10 - 4 mA. 1 Fraktion $\hat{=}$ 1 ml. — : OD₂₈₀, ---- : Radioaktivität

----- : Acetyltransferase, $\left[\frac{\Delta E_{334}}{\text{Min} \times 100 \mu\text{l}} \right]$

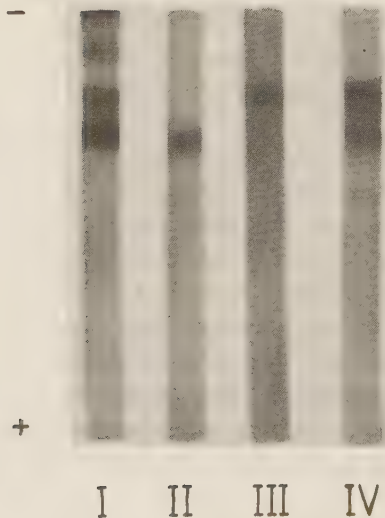


Abb. 23

Analytische Diskgelelektrophorese: System Maurer 1, 5 %ige Gele, zu Abb. 22. Aufgetragen wurden auf Gel

I: CA-Standardspaltansatz nach 20 Std. bei 4°C, ca. 15 μ g.

II: 50 μ l Fraktion 32 (Abb. 22)

III: 100 μ l Fraktion 60 (Abb. 22)

IV: 50 μ l Fraktion 32 und 100 μ l Fraktion 60 (Abb. 22).

konnten um 5 % des aufgesetzten Materials (ca. 5 mg) nach 25 Stunden als getrennte Untereinheiten in löslicher Form erhalten werden, d.h. 100-150 μg pro Untereinheit. Die einzelnen Ansätze ließen sich wegen des Kühlproblems bei dickeren Gelringdurchmessern auch nicht beliebig vergrößern.

IV 2 Isolierung der Untereinheiten durch Rohrzuckergradienten-Zentrifugation

Die Möglichkeit einer Trennung der Untereinheiten in größerer Ausbeute ergab sich auf unerwartete Weise aus folgendem Experiment: In α radioaktiv markierter DMMA-Spaltansatz war auf Rohrzuckergradienten nach Martin und Ames (87) zentrifugiert worden, um einen weiteren Anhaltspunkt für die Abschätzung des Molekulargewichts der dissoziierten PSS zu erhalten. Die in Abb. 24 dargestellten Elutionsprofile solcher Gradienten zeigten eine Verschiebung des Maximums der Proteinabsorption bei 280 nm gegen das Maximum der Radioaktivität um eine Fraktion zum Boden des Gradienten hin. Da sich dieses Ergebnis als sauber reproduzierbar erwies und die Zentrifugationsdauer 15 Stunden betragen hatte, wurde nun versucht, die erwähnte Verschiebung durch längere Zentrifugation zu verstärken. Abb. 25 zeigt das Elutionsprofil eines solchen Gradienten, der 42 Stunden zentrifugiert worden war. Deutlich erscheinen zwei voneinander getrennte Gipfel der Absorption bei 280 nm. Das Material des weiter eingewanderten Gipfels besaß Acetyltransferase-Aktivität, die der andere Gipfel nicht zeigte. Dieser enthielt jedoch die gesamte Radioaktivität. Die Proteine verhielten sich also in der Dichtegradienten-Zentrifugation ebenso wie auf der "nativen" Gelelektrophorese. β war schneller gewandert als α . Damit war es möglich, die Untereinheiten in einem präparativen Maßstab zu isolieren.

Dieses Ergebnis war unerwartet, da das Molekulargewicht der beiden Proteine sehr ähnlich ist (β ist sogar um knapp

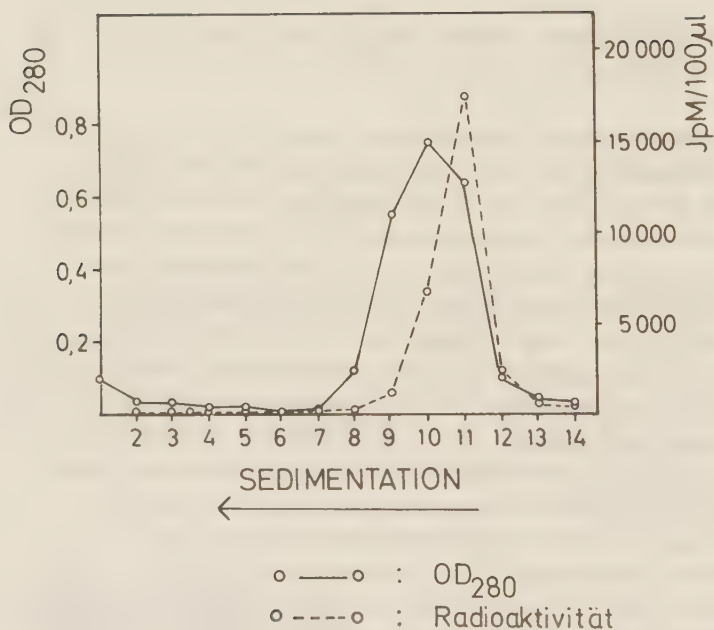


Abb. 24

Rohrzuckerdichtegradienten-Zentrifugation von α -1-¹⁴C-CAM-FSS nach DMMA-Standardspaltung und Äquilibrieren mit 0.02 M Tris/HCl-Puffer pH 7.5, 1 mM DTT: Aufgetragen wurden 2.5 mg Spaltansatz in 0.75 ml. Gradient: 8-25 % Rohrzucker, 0.02 M Tris/HCl pH 7.5, 1 mM DTT. Laufzeit 15 Stunden bei 41 000 UpM und 2°C. Eine Fraktion enthält ~0.9 ml.

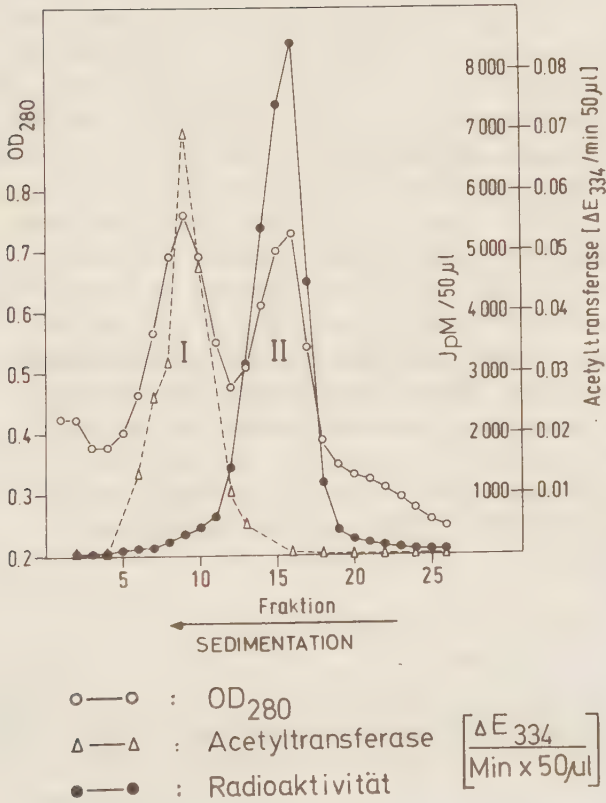


Abb. 25

Rohrzuckerdichtegradienten-Zentrifugation von α -¹⁴C-CAM-FSS nach DMMA-Standardspaltung. Durchführung wie in Abb. 24, jedoch war der Gradient 10 - 20 %ig an Rohrzucker, und die Laufzeit betrug 42 Stunden.

3 % leichter als α). Selbst wenn man den Extremfall annimmt, daß ausschließlich freie Amine der Untereinheit β acyliert worden wären, ergäbe sich unter Berücksichtigung der eingeführten Säuregruppen nur ein Molekulargewicht von etwa 189 000 für β .¹⁾ Die hieraus resultierende Gewichts Differenz wäre bei weitem zu klein, um das deutlich unterschiedliche Wanderungsverhalten der beiden Ketten zu erklären. Als Grund dafür wird deshalb ein unterschiedlicher Faltungszustand der Proteine angenommen, d.h., daß im dissoziierten Zustand β eine mehr globuläre Struktur aufweist als α . Diese Annahme wurde unterstützt durch ein Gelfiltrationsexperiment. War α wirklich stärker aufgefaltet als β , so sollte dieses Protein bei Chromatographie an Sepharose 6 B früher von einer Säule eluiert werden als β , da ein Molekül mit einem größeren Radius weniger gut in die Poren des Gels einzudringen vermag. Das in Abb. 26 dargestellte Chromatogramm eines in α radioaktiv markierten Spaltansatzes an Sepharose 6 B bestätigte die Annahme: Das Maximum der Radioaktivität und damit α wird tatsächlich einige Fraktionen früher eluiert als das Maximum der Proteinabsorption.

IV 3 Analytik der isolierten Spaltstücke

IV 3 a Elektrophoresen

Abb. 27 zeigt die gelelektrophoretische Analytik der beiden Gipfel von Abb. 25, und zwar auf nativen Diskgelen (Abb. 27 A) und mit der in Kapitel III beschriebenen Modifizierungsmethode (B). Die Banden in der unteren Hälfte der Gele II, III und IV stellen Rinderserumalbumin dar, das zur Erhöhung der Proteinkonzentration bei der Aufarbeitung der Fraktionen von präparativen Rohrzuckergradienten manchmal zugesetzt werden mußte. Die Maxima der beiden Gipfel entsprachen wiederum, wie bei der präparativen Gelelektrophorese, elektrophoretisch unterschiedlichen Einzelproteinen, mit der Einschränkung, daß bei α eine schwache schneller wandernde Bande auftrat, bei der es sich wahrscheinlich um das bereits im vorigen

¹⁾ vgl. Kapitel IV 3 b

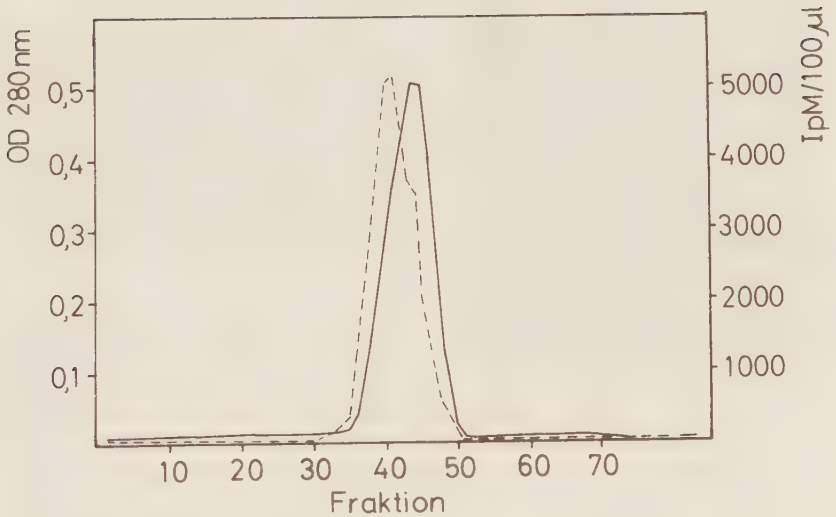


Abb. 26

Chromatographie eines α - ^{14}C -CAM-FSS-Spaltansatzes an Sepharose 6 B. Es wurden ca. 10 mg radioaktiver Spaltansatz in 3 ml aufgetragen. Durchführung s. exp. Teil. Eine Fraktion enthält ca. 2,5 ml.

— OD₂₈₀
----- Radioaktivität

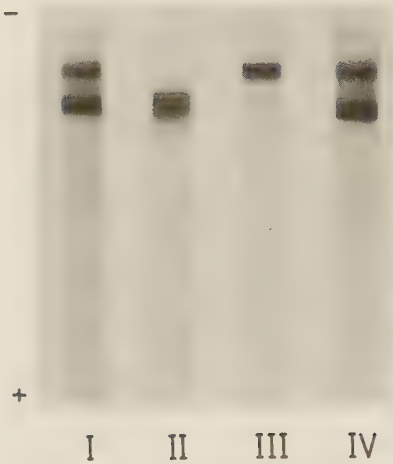


Abb. 27 A

"Native" analytische Disk-Gel-elektrophorese von (I) α - ^{14}C -CAM-FSS nach DMMA-Standardspaltung; (II) Fraktion Nr. 8, Abb. 25, 50 μl ; (III) Fraktion Nr. 16, Abb. 25, 50 μl ; (IV) Fraktionen 8 und 16, Abb. 25, 35 und 35 μl . Durchführung s. exp. Teil - Gele 5 %ig an Acrylamid, System Maurer 1.

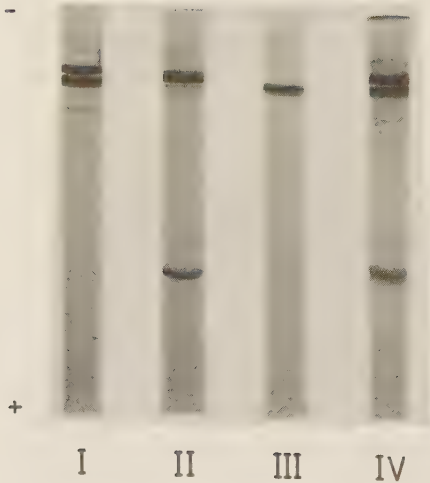


Abb. 27 B

Analytische Gelelektrophorese in Gegenwart von Harnstoff nach Carboxymethylierung und erschöpfender Citraconylierung.

- I: FSS, Gesamtenzym, ca. 50 μg
II: Probe aus Gipfel I (Fr. 5,6, 7,8 und 9) Abb. 25
III: Probe aus Gipfel II (Fr. 16, 17,18 und 19) Abb. 25
IV: Probe aus Gipfel I und Gipfel II, Abb. 25, gemischt.

Kapitel erwähnte α' handelte.

IV 3 b Aminosäureanalysen

Einer weiteren Charakterisierung der Untereinheiten sollte die Analyse ihrer Aminosäurezusammensetzung dienen. Dazu wurden Proben aus den Gipfeln von Rohrzuckergradienten (vgl. Abb. 25) durch Gelfiltration in einem flüchtigen Puffer von nicht flüchtigem Begleitmaterial befreit, lyophilisiert und salzsauer hydrolysiert (Einzelheiten im experimentellen Teil). Die in Tab. 6 angegebenen Werte wurden durch Extrapolation von Werten aus vier Hydrolysezeiten (24, 48, 72 und 96 Stunden) auf den Zeitpunkt Null erhalten. Grundlage zur Berechnung der Aminosäuregehalte waren die Molekulargewichte 185 000 für α , 180 000 für β und 2 300 000 für das Gesamtzym (22,5). Zur Bestimmung freier SH-Gruppen wurden die Proben mit Dithiothreit reduziert und dann durch Gelfiltration von Reagens befreit. Die Messung erfolgte mit der DTNB-Methode (49), als Bezugswerte dienten Cystein-Eichkurven. Tryptophan wurde spektrophotometrisch nach Goodwin bestimmt (88).

Um die Zusammensetzung der Polypeptide unabhängig von ihrem Molekulargewicht vergleichen zu können, ist der relative Aminosäuregehalt für α , β , FSS und für einen aus α und β in 1:1-Stöchiometrie berechneten Komplex in Tab. 7 aufgeführt, und zwar jeweils bezogen auf 1000 Aminosäuren. Außerdem werden die Werte verglichen mit einer ebenfalls auf 1000 Aminosäuren normierten Zusammensetzung des Gesamtzyms, wie sie aus Daten von Oesterheld (89) hervorgeht. Dieser Vergleich zeigt:

1. Die Zusammensetzung der Polypeptide α und β ist recht ähnlich. Dies überrascht bei den großen Molekulargewichten der Ketten nicht. Das Gesamtzym ist in der Aminosäurezusammensetzung z.B. auch recht ähnlich der Acetyl-CoA-Carboxylase aus Hefe (26). Trotzdem ergeben sich einige deutliche Unterschiede zwischen α

aus 6 α - und 6 β -Untereinheiten berechnet wurde (III), sowie der FSS (IV). In Spalte V ist die Zusammensetzung gezeigt, die Oesterheld für kristallisierte FSS gefunden hat. Die Zahlen bedeuten Mol Aminosäure pro 1 Mol Protein. (Einzelheiten sind im experimentellen Teil beschrieben).

Aminosäure	I α (1 Mol=185000g)	II β (1 Mol=180000g)	III 6 α + 6 β (1 Mol=2.19x10 ⁶ g)	IV FSS (1 Mol=2.3x10 ⁶ g)	V FSS-Kristalle ⁺ (Oesterheld (6)) (1 Mol=2.17x10 ⁶ g)
Lysin	128	112	1440	1485	1260
Histidin	28	32	360	371	326
Arginin	62	60	732	768	720
Asparagin + Asparaginsäure	154	165	1914	1989	2040
Threonin	99	107	1236	1199	1160
Serin	118	102	1320	1331	1240
Glutamin + Glutaminsäure	206	170	2256	2401	2280
Prolin	74	113	1122	1120	920
Glycin	125	106	1386	1435	1430
Alanin	154	106	1560	1632	1470
Valin	112	125	1422	1463	1335
Methionin	41	40	486	468	465
Isoleucin	99	104	1218	1262	1160
Leucin	138	142	1680	1793	1630
Tyrosin	54	49	618	661	582
Phenylalanin	64	88	912	967	818
-SH	9	12	126	128	142 (Cystein)
Tryptophan	14	14	168	187	398

+ Oesterheld gibt als Berechnungsgrundlage ein Molekulargewicht von 2.3×10^6 an. Addiert man jedoch die Molekulargewichte der Aminosäuren, multipliziert mit den Zahlen in Spalte V, und zieht für jede Aminosäure die Masse 18 (H₂O) ab, so ergibt sich ein Molekulargewicht von 2.17×10^6 . Dies erklärt die insgesamt kleineren Zahlen der Oesterheld'schen Werte gegenüber den in Spalte IV gezeigten Werten. Die Diskrepanz der Oesterheld'schen Werte ergibt sich, weil bei dieser Berechnung die Gegenionen der basischen und sauren Aminosäuren mitberücksichtigt der Analyse (90).

	I	II	III	IV	V
Aminosäure (1 Mol=185000g)	α (1 Mol=185000g)	β (1 Mol=180000g)	$6\alpha + 6\beta$ (1 Mol=2.19x10 ⁶ g)	FSS (1 Mol=2.3x10 ⁶ g)	FSS-Kristalle (Oesterheilt (89))
Lysin	76	68	72	72	70
Histidin	17	19	18	18	17
Arginin	37	36	37	37	35
Asparagin + Asparaginsäure	92	100	96	96	102
Threonin	59	65	62	58	59
Serin	70	62	66	65	65
Glutamin + Glutaminsäure	123	103	113	116	115
Prolin	44	69	56	54	48
Glycin	74	64	69	70	69
Alanin	92	64	78	79	72
Valin	67	76	71	71	72
Methionin	24	24	24	23	25
Isoleucin	59	63	61	61	63
Leucin	82	86	84	87	88
Tyrosin	32	30	31	32	30
Phenylalanin	38	53	46	47	43
-SH	5	7	6	6	7
Tryptophan	8	9	8	9	21
Summe	1000	998	998	1001	1001

und β , und zwar im Gehalt an Lys, Gln und Glu, Pro, Ala und Phe (Spalten I und II in Tab. 7).

2. Berechnet man einen Komplex aus 6 α - und 6 β -Untereinheiten und normiert wegen des Molekulargewichtsunterschiedes zum FSS-Komplex (2.19×10^6 statt 2.3×10^6) auf 1000 Aminosäuren, so ergibt sich eine recht gute Übereinstimmung zwischen berechneter und tatsächlich gefundener Zusammensetzung (Tab. 7 Spalten III und IV).
3. Die für FSS gefundenen Werte stimmen mit Oesterhelts Angaben für kristallisierte FSS bei den meisten Aminosäuren recht gut überein, weichen jedoch bei Ala und Pro, und besonders stark bei Trp ab. Dabei ist zu berücksichtigen, daß mit der Zeit FSS mit immer höheren spezifischen Aktivitäten isoliert wurde (Oesterhelts gibt 1500-2500 mE/mg an, in der vorliegenden Arbeit wurden Präparate mit 2500-3500 mE/mg eingesetzt). Trp wurde in beiden Fällen photometrisch bestimmt. Hierbei können als Kontamination vorliegende Nukleinsäuren erheblich stören. Deshalb wurde FSS für diese Aminosäureanalyse durch fraktionierte Salzfällungen und wiederholte Ultrazentrifugation nachgereinigt, bis die Präparation ein konstantes Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm aufwies. Dieses Verhältnis $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$ betrug 0.63.

IV 4 Teilaktivitäten in den isolierten Untereinheiten

Meßbare Restaktivitäten in den isolierten Untereinheiten sind in Tab. 8 aufgeführt. Ein Vergleich des Acylierungsgrades von DMMA-behandelter FSS, die eine Stunde und 45 Stunden nach Modifizierung unter den Temperatur- und Pufferbedingungen der Zuckergradienten für die Anreicherung der Untereinheiten inkubiert worden war (3 - 4°C, pH 7.5) ergab, daß nach Trennung der Polypeptide etwa ein Drittel

Tab. 8: Restaktivitäten in den isolierten Untereinheiten vor Reaktivierung (in % der spezifischen Ausgangsaktivitäten nativer FSS)

Aktivität	α	β
Acetyltransferase	0	40
Malonyltransferase	0	≤ 3
Enoylreduktase	0	0
β -Ketoacylreduktase	0	0
β -Ketoacylsynthase	0	0
Dehydratase	0	180

Tab. 9 : Teilaktivitäten in den isolierten Untereinheiten nach Hydrolyse der Dimethylmaleinsäuregruppen und Inkubation unter Reaktivierungsbedingungen (in % der spezifischen Ausgangsaktivitäten nativer FSS)

Aktivität	α	β
Acetyltransferase	0	145
Malonyltransferase	0	25
Enoylreduktase	0	95
β -Ketoacylreduktase	0	0
β -Ketoacylsynthase	0	0
Dehydratase	0	180

der Dicarbonsäureamide hydrolysiert war. Die Untereinheiten lagen also nach ihrer Isolierung noch zu einem beträchtlichen Ausmaß modifiziert vor. Daher wurden sie den Reaktivierungsbedingungen ausgesetzt, die in Kapitel II beschrieben sind. Zur Erhöhung der Proteinkonzentration wurde bei Lösungen unter 0.5 mg/ml Serumalbumin bis zu einer Gesamtprotein-konzentration von 0.5 mg/ml zugesetzt.

Die Untereinheiten wurden getrennt und gemischt zur Reaktivierung inkubiert. Die maximal erreichbaren Werte der Teilaktivitäten sind in Tab. 9 zusammengestellt. Das Gemisch der vorher isolierten Untereinheiten konnte auf diese Weise nicht zur Aktivität in der Gesamtreaktion reaktiviert werden. Wahrscheinlich waren die Proteine, besonders α , durch die lange Zentrifugation unter dissoziierenden Bedingungen in einer irreversiblen Weise entfaltet, die eine Reaggregation zum Komplex verhinderte. Bestimmte man die Gesamtreaktionsausbeuten, wenn man DMMA-behandelte FSS unter den Trennbedingungen stehen ließ, und zu verschiedenen Zeitpunkten reaktivierte, fand sich diese Annahme bestätigt: Nach 45 Stunden war die Gesamtaktivität nur noch zu wenigen Prozenten reaktivierbar (Abb. 28). Will man die isolierten Untereinheiten zur Gesamtaktivität reaktivieren, bedarf es folglich eines wesentlich schnelleren Anreicherungsverfahrens. In Kapitel V werden spezifische Antikörper gegen die beiden Untereinheiten beschrieben. Deren Einsatz zur schnellen Präzipitation und damit Abtrennung jeweils eines Polypeptids aus Spaltgemischen soll eine genügend schnelle Isolierung der beiden Ketten ermöglichen. Abb. 29 zeigt die Zeitverläufe der Reaktivierung von Teilaktivitäten in der isolierten β -Untereinheit. Es fällt auf, daß sich die Teilenzyme der β -Ketten ähnlich verhalten wie bei der Reaktivierung des Spaltgemischs (vgl. Kapitel II). Die Teilaktivitäten β -Ketoacylsynthetase und β -Ketoacylreduktase (von Schweizer beide der α -Untereinheit zugeordnet) kehren nicht zurück.

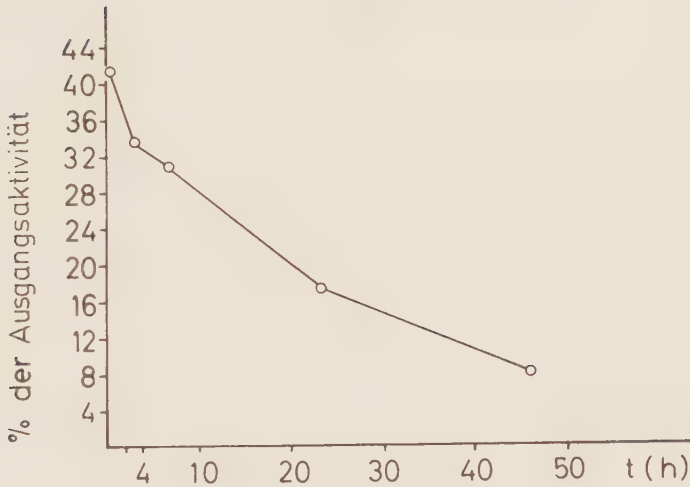


Abb. 28

Zeitabhängigkeit der Reaktivierbarkeit von DMMA-gespaltener FSS: FSS wurde der DMMA-Standardspaltung unterworfen, durch Gelfiltration in 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7.5, 1 mM DTT umäquiliibriert und bei 4°C stengelassen. Zu den genannten Zeitpunkten wurden Aliquote der Inkubation entnommen, mit einem gleichen Volumen an 2 M Tris/Ac-Puffer pH 8.1 versetzt und der sauren Ammoniumsulfatbehandlung unterworfen, in Reaktivierungspuffer aufgenommen und nach Gelfiltration in Reaktivierungspuffer bei 25°C inkubiert (S. auch Kap. II und exp. Teil). Nach 90 Min. erfolgte jeweils die Bestimmung der Gesamtaktivität.

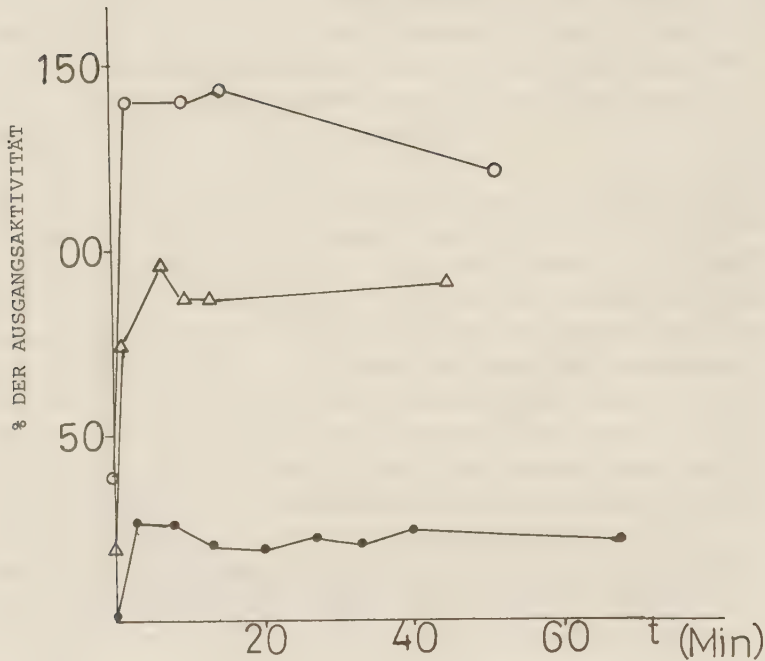


Abb. 29

Zeitverlauf der Reaktivierung von Teilreaktionen in der isolierten β -Untereinheit der FSS: Das isolierte Protein wurden der sauren Ammoniumsulfatbehandlung unterworfen, mit Reaktivierungspuffer äquilibriert und anschließend bei 25°C inkubiert. (Durchführung s. Kapitel II und exp. Teil.) Anschließend wurden zu den aufgeführten Zeitpunkten die Aktivitäten der genannten Reaktionen bestimmt. Zur Bestimmung der Enoylreduktase wurden Aliquote der Reaktivierungsansätze durch Chromatographie an Sephadex G50 in thioolfreiem Reaktivierungspuffer von überschüssigem Thiol befreit.

- : Acetyltransferase
- △—△ : Enoylreduktase
- : Malonyltransferase

IV 5 Aggregationsverhalten der isolierten Untereinheiten

Neben der Messung des Reaktivierungsverhaltens schien auch die Untersuchung des Aggregationsverhaltens der beiden Proteine interessant. Dazu wurden sie Reaktivierungsbedingungen unterworfen und dann getrennt und gemischt auf Rohrzuckergradienten zentrifugiert. Aus ihren Wanderungsverhalten geht hervor:

1. α neigt entweder zur Bildung von Aggregaten verschiedener Molekulargewichte oder das Protein ist bereits so denaturiert, daß es sich polydispers verhält (32,91) (Abb. 30 A). Hierfür spricht, daß Material aus Fraktionen von der Mitte des Gradienten bis zum Boden nicht in 4 %ige Polyacrylamidgele einwandert, also Startausfall zeigt. Dieses Verhalten ist ein wesentliches Merkmal irreversibel denaturierter FSS.
2. Die β -Untereinheit hingegen liegt auch unter Reaktivierungsbedingungen als Monomeres vor (Abb. 30 B). Dies deckt sich mit Beobachtungen von Hess (92).
3. Die Mischung der beiden Ketten führt zu keinem Aggregat ähnlich dem FSS-Komplex.

Zusammenfassende Diskussion zu Kapitel IV

Eine präparative Isolierung der Untereinheiten α und β der FSS gelingt durch Rohrzuckerdichtegradienten-Zentrifugation. Bei gleichzeitigem Einsatz von 3 Rotoren (18 Becher) können in ca. 45 Stunden 3-5 mg jeder Untereinheit erhalten werden. Die deutliche Auftrennung des dissoziierten Enzyms in zwei Gipfel ist wahrscheinlich auf verschiedene Faltungszustände der beiden Ketten nach Dissoziation des Komplexes zurückzuführen.

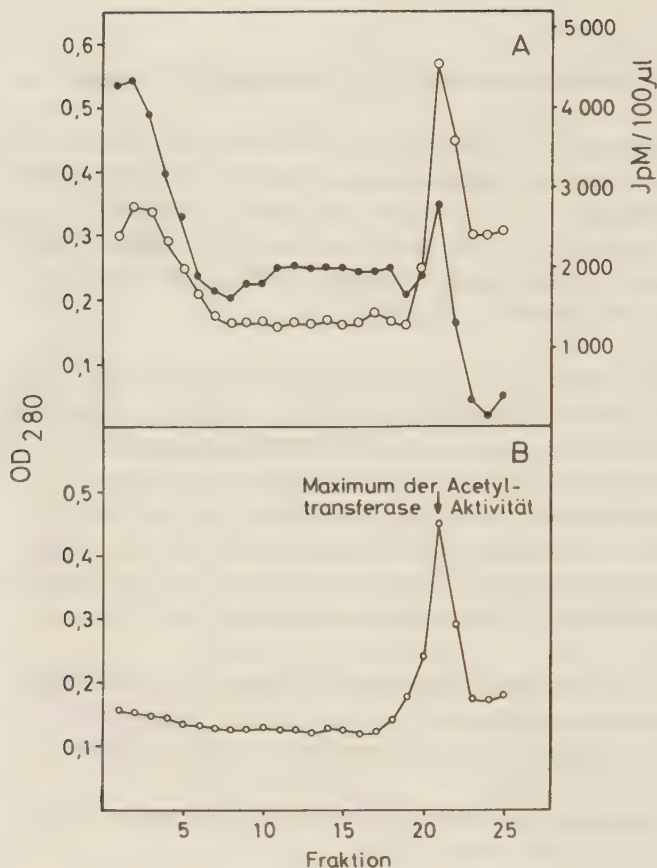


Abb. 30

Rohrzuckerdichtegradientenzentrifugation der isolierten Untereinheiten α (A) und β (B) der FSS nach Abspaltung der Dimethylmaleinsäuregruppen und Inkubation unter Reaktivierungsbedingungen. Die Proben wurden der sauren Ammoniumsulfatbehandlung unterworfen (s. Kap. II und exp. Teil) und nach Äquilibrieren mit Reaktivierungspuffer 100 Min. bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden sie auf Rohrzuckergradienten (0.1 M K-Phosphat, pH 7.5, 5 mM DTT, 1.5 ml 50 %ig an Rohrzucker als "Polster", darüber 8 - 25 % Rohrzucker) aufgetragen und 8 Stunden bei 40 000 UpM und 2°C zentrifugiert. (α = ca. 1.5 mg, spez. Radioaktivität 2.9×10^5 Ipm/mg, β ca. 1.0 mg, beide Proben enthielten ca. 0.6 mg Rinderserumalbumin).

○—○ : OD₂₈₀

●—● : Radioaktivität

Die isolierten Polypeptide wurden gelelektrophoretisch und durch Analyse ihrer Aminosäurezusammensetzung charakterisiert. Sowohl bei Elektrophorese in verschiedenen Systemen als auch im Gehalt an einzelnen Aminosäuren unterscheiden die beiden Proteine sich deutlich. Der Vergleich berechneter Werte für eine 1:1-Stöchiometrie von α und β im Komplex mit den für Gesamt-FSS gefundenen Werten macht eine solche Stöchiometrie wahrscheinlich. Auch ein Flächenvergleich der beiden Gipfel I und II in Abb. 25 spricht für eine 1:1-Stöchiometrie.

Zusätzlich zu den bereits proteinchemisch lokalisierten Teilreaktionen konnten noch die Enoylreduktase und die Dehydratase der β -Kette zugeordnet werden. Das Schema in Abb. 31 gibt einen Überblick über die Verteilung der Einzelaktivitäten der FSS auf ihre beiden Untereinheiten und über die Art der Experimente, die zu den Ergebnissen geführt haben: "g" bedeutet "auf genetischer Basis", "p" bedeutet "proteinchemisch" und "e" bedeutet "enzymatische Aktivität, in der isolierten Untereinheit gemessen". Damit ist die Lokalisation aller Teilenzyme so, wie Schweizer sie auf Grund seiner genetischen Daten vorgeschlagen hatte, durch mindestens eine zusätzliche Methode bestätigt worden, bis auf die β -Ketoacylreduktase. Da diese Aktivität offensichtlich von einer Interaktion und höher geordneten Struktur der Untereinheiten abhängt, und keine Möglichkeit zu einer kovalenten Beladung dieses Teilenzym mit seinem Substrat besteht, sind zur genetischen Evidenz zusätzliche Beweise für die Lage der 1. Reduktase auf Polypeptid α gegenwärtig weder enzymologisch noch proteinchemisch erhältlich.

Die bisher beschriebenen Ergebnisse bestätigen, daß die Untereinheiten der FSS multifunktionelle Polypeptide sind. Die Untereinheit β mit einem Molekulargewicht von 180 000 ist tatsächlich in der Lage, fünf verschiedene enzymatische Aktivitäten zu katalysieren.

UNTEREINHEIT α	UNTEREINHEIT β
ACP G P β - KETOACYLSYNTHETASE G P β - KETOACYLREDUKTASE G	ACETYLTRANSFERASE P E G MALONYLTRANSFERASE G P E PALMITYLTRANSFERASE G P DEHYDRATASE G E ENOYLREDUKTASE G E

Abb. 31: Überblick über Teilaktivitäten

in den isolierten Untereinheiten der FSS.

Bedeutung der Abkürzungen:

G = "genetisch", P = "proteinchemisch",
 und E = "durch Messung der enzymatischen
 Aktivität im isolierten Protein" nachgewiesene
 Teilaktivität

Sie stehen jedoch in krassem Widerspruch zu Ergebnissen, die kürzlich von der Arbeitsgruppe um Porter bezüglich der Hefe-FSS veröffentlicht wurden (44, 93). Diese Unterschiede sind im Folgenden aufgeführt (vgl. auch Vorbemerkung):

1. Das ACP sei nicht kovalent in der FSS-Untereinheit α integriert, sondern durch Ultrafiltration nach Dissoziation des Komplexes vom übrigen Protein abzutrennen. (Im Widerspruch zu Schweizer (22)).
2. Im Gegensatz zu Ergebnissen aus dem Lynenschen Arbeitskreis wird eine Palmityldeacylase-Aktivität im Komplex und in beiden isolierten Untereinheiten beschrieben. In ihrem Ausmaß ist diese Aktivität vergleichbar mit den Palmityldeacylasen der tierischen FSS.
3. Im Gegensatz zu allen bisher erwähnten Beobachtungen (20) wird nach Dissoziation des Komplexes deutlich meßbare Aktivität der β -Ketoacylreduktase berichtet. Darüber hinaus wurde dieses Teilenzym auf der Untereinheit lokalisiert, die auch die Enoylreduktase-reaktion katalysiert.
4. Dehydrataseaktivität wird für beide isolierten Untereinheiten beschrieben.
5. Über die Lage des Coenzym FMN auf den Untereinheiten wird keine Auskunft gegeben. Es wird auch nicht über die Notwendigkeit berichtet, bei Rekonstitutionsexperimenten FMN zuzugeben. Die Reaktivierung der isolierten Untereinheiten zur Gesamtreaktion gelang ohne FMN.

Zumindest bei der LiCl-Spaltung und der Dissoziation durch partielle Acylierung jedoch dissoziiert der größte Teil des FMN vom Protein ab.

Es wurde bereits erwähnt, daß die von den Autoren beschrie-

bene Dissoziationsmethode von uns nicht reproduziert werden konnte. In ihrer Arbeit wurde FSS mit weniger als einem Achtel der spezifischen Aktivität eingesetzt, verglichen mit Präparaten, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Bisher ist es nicht gelungen, den Komplex aus den einmal isolierten Untereinheiten zu reaktivieren. Wahrscheinlich wird besonders die Untereinheit α während der langen Trennzeit irreversibel geschädigt. Polypeptid β neigt nicht zur Aggregation mit sich selbst, für α konnte dies bisher nicht entschieden werden. Die Aktivitäten der Untereinheit β reaktivieren im isolierten Protein im Zeitverlauf ähnlich dem (vorher nicht aufgetrennten) Untereinheitengemisch. Dies schließt einen kooperativen Effekt durch Interaktion der Untereinheiten verschiedenen Typs für diese Teilaktivitäten aus. Da β auch unter Reaktivierungsbedingungen nur als Monomeres auftritt, kann man eine Kooperativität durch Wechselwirkung dieses Proteins mit sich selbst ebenfalls verneinen. Für die β -Ketoacylsynthetase und β -Ketoacylreduktase ist eine solche Kooperativität der Untereinheiten wahrscheinlich, weil diese Aktivitäten im dissoziierten Zustand nicht mehr meßbar sind. Allerdings wäre auch eine Wechselwirkung von α -Untereinheiten allein für einen solchen Effekt vorstellbar. Die Beantwortung solcher Fragen könnte weiteren Einblick in den Aufbau des Komplexes vermitteln.

V Herstellung und Charakterisierung von Kaninchenantikörpern gegen die Untereinheiten

Mit den Untereinheiten α und β , charakterisiert wie im vorigen Kapitel beschrieben, wurden Kaninchen immunisiert (ein Schema hierfür ist im experimentellen Teil dargestellt). Nach 10 Wochen und 6 Impfungen ergaben sich im Ouchterlony-Diffusions-Test (94) für die Seren folgende Titer: Anit- α -Serum 1:8, Anti- β -Serum 1:16. Von Hess her-

gestellte Antiseren gegen den Gesamtkomplex wiesen Titer um 1:32 auf. Diese Titer schwankten bei dreiwöchentlicher Nachimpfung der Tiere nur unwesentlich.

Ebenso wie das Anti-FSS-Antiserum waren auch das Anti- α - und das Anti- β -Antiserum in der Lage, den nativen Komplex zu präzipitieren.

V 1 Zur Spezifität der Antikörper

Ouchterlony-Diffusionsversuche als Hinweis auf die Spezifität der Antiseren führten zu dem in Abb. 32 dargestellten Ergebnis: Anti-FSS-Serum reagierte außer mit dem nativen Enzym sowohl mit α als auch mit β (95). Anti- β -Serum präzipitierte neben dem nativen Komplex ausschließlich die β -Untereinheit (A). Anti- α -Serum bildete neben einer Präzipitationslinie mit FSS ganz bevorzugt eine Linie mit α , zeigte jedoch auch eine schwache Präzipitation von β , schien also nicht ganz so spezifisch wie Anti- β -Serum für sein Antigen zu sein (B).

Um die Antikörper weiter zu charakterisieren und quantifizieren, wurden die Immunoglobulin G-Fractionen aus den Seren angereichert. Der Nachweis reiner Immunoglobuline (IgG) wurde durch SDS-Gelelektrophorese dieser Fractionen erbracht. Es waren unter reduktiven Bedingungen jeweils nur zwei Banden entsprechend den H- und L-Ketten der IgG zu beobachten. Dieser Reinheitsnachweis schien nötig, um für weitere Versuche etwaige Kontaminationen der eingesetzten Antikörper mit proteolytischen Aktivitäten weitgehend auszuschließen.

Mit so gereinigten IgG-Fractionen wurde nun das Präzipitationsverhalten der Antikörper genauer untersucht. Dazu wurde FSS, die in Untereinheit α mit ^{14}C -IAM radioaktiv markiert war (vgl. Kapitel I), mit DMMA dissoziiert und konstante Mengen dieses Spaltansatzes mit steigenden Mengen

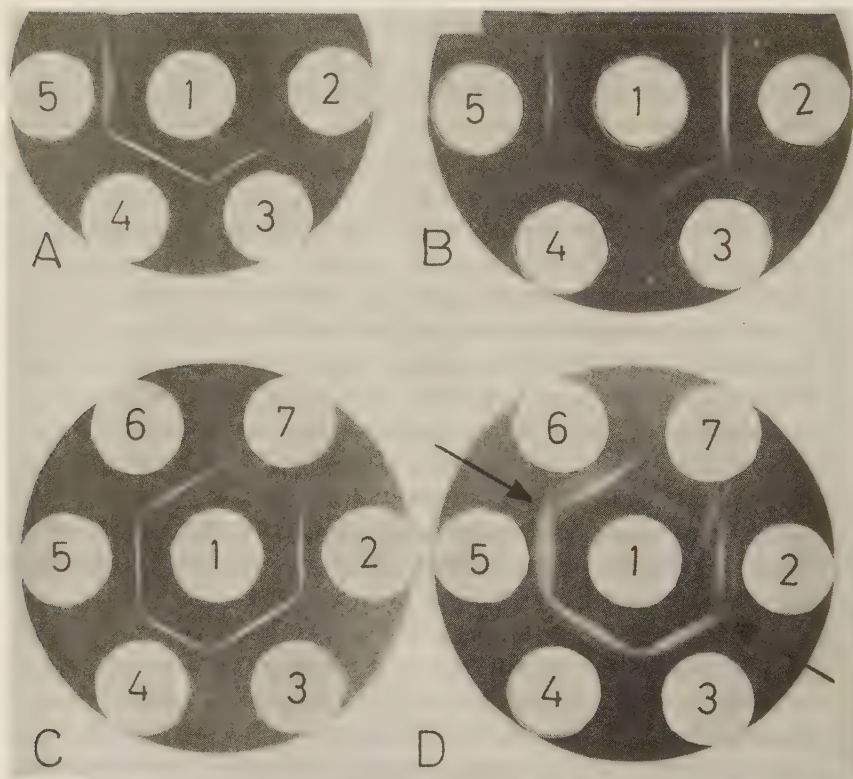


Abb. 32

Doppeldiffusion nach Ouchterlony (94).

In jedes Loch wurden 70 μ l der genannten Lösungen pipettiert (α , β , FSS nativ und FSS-DMMA jeweils ca. 1 mg/ml, Durchführung s. exp. Teil).

- A: 1: Anti- β -Serum, 1:4 mit 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, verdünnt;
2: α , 3: FSS nativ, 4: β , 5: FSS nativ;
B: 1: Anti- α -Serum, 1:2 verdünnt, 2: α , 3: FSS nativ
4: β , 5: FSS nativ;
C: 1: Anti- β -IgG (5 mg/ml), 2: FSS nativ, 3: β , 4: FSS-DMMA-
Standardspaltansatz, 5: β , 6: FSS nativ, 7: α ;
D: 1: Anti- α -IgG (15 mg/ml), 2: FSS nativ, 3: α , 4: FSS-DMMA-
Standardspaltansatz, 5: α , 6: FSS nativ, 7: β .

der Antikörper inkubiert. Nach Zentrifugation der Ansätze wurde in den Überständen Radioaktivität und die Aktivität der Acetyltransferase bestimmt. Die Radioaktivität ist ein quantitatives Maß für die Gegenwart von α -Untereinheit; die Acetyltransferase kann als quantitatives Maß für die Anwesenheit der β -Untereinheit gewertet werden, weil diese Teilaktivität von keinem der Antikörper gehemmt wird, und auch in Gegenwart vergleichbarer Konzentrationen an Kontroll-IgG nicht verändert wird.

Diese Messungen ergaben die in Abb. 33 dargestellten Kurven: Die Anti- β -IgG bestätigten ihre hohe Spezifität für das β -Polypeptid, wohingegen die Kreuzreaktion der Anti- α -IgG mit β auf etwa 15 % eingeschätzt werden muß. Deshalb wurden die Anti- α -Antikörper für die folgenden Untersuchungen durch Inkubation mit der berechneten Menge an β -Polypeptid und anschließender Zentrifugation "neutralisiert". Abb. 34 zeigt das Präzipitationsverhalten so behandelter Anti- α -IgG im Ouchterlony-Diffusionstest. Ein Vergleich mit Abb. 32 (B) führt zu dem Schluß, daß nun auch die Anti- α -Antikörper, zumindest nach dem angewendeten Kriterium, spezifisch nur für das Polypeptid α waren.

In Abb. 32 C und D wird das Präzipitationsverhalten der Anti- β - und Anti- α -Immunglobuline gegenüber ihren Antigenen und dem nativen Komplex verglichen. Anti- β -Antikörper bilden durchgehende Präzipitationslinien mit β -Untereinheit, FSS und mit DMMA-dissoziierter FSS, d.h., in allen drei Fällen ist die Zahl der für Antikörper erreichbaren antigenen Determinanten gleich groß.

Anti- α -Antikörper bilden eine durchgehende Präzipitationslinie mit α -Untereinheit und mit DMMA-dissoziierter FSS. Mit nativer FSS als Nachbar von α -Polypeptid im Ouchterlony-Test zeigt sich jedoch eine deutliche Spornbildung: Die Anti- α -IgG- α -Untereinheit-Präzipitationslinie ragt über die Linie hinaus, die mit nativem Enzym gebildet wird. Dies deutet

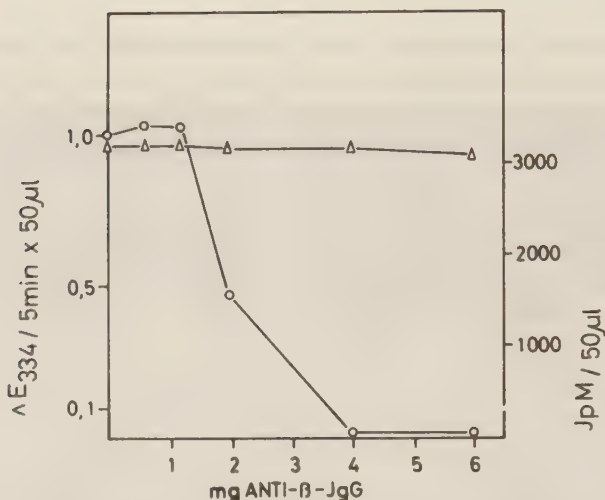


Abb. 33 A Jeweils 200 μg α -1- ^{14}C -CAM-FSS nach DMMA-Standard-spaltung wurden mit den angegebenen Mengen an Anti- β -IgG versetzt. Endvol. 0.5 ml, Puffer: 0.02 M Tris pH 7.5. Inkubation 30 Min. bei 25°C. Anschließend wurde 6 Min. bei 10 000 g zentrifugiert, und in je 50 μl der Überstände die Acetyltransferaseaktivität und die Radioaktivität bestimmt. ○—○: Acetyltransferase, Δ—Δ: Radioaktivität.

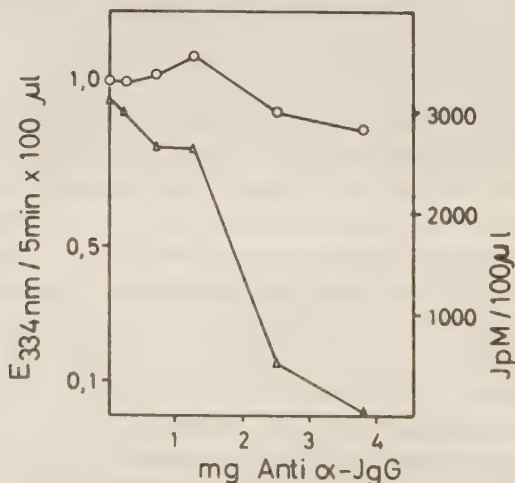


Abb. 33 B Wie Abb. 33 A, jedoch wurden jeweils 50 μg radioaktiver Spaltansatz mit den angegebenen Mengen Anti- α -IgG versetzt, Endvol. 0.25 ml, und jeweils 100 μl der Überstände nach Zentrifugation zur Bestimmung der Acetyltransferase und der Radioaktivität eingesetzt.

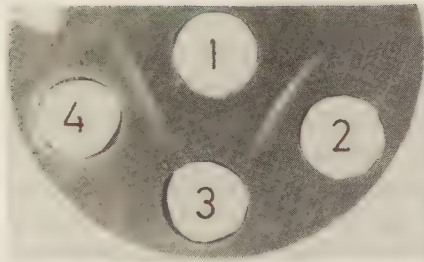


Abb. 34: Doppeldiffusion nach Ouchterlony (94).
Es wurden jeweils 70 μ l der angegebenen Lösungen pipettiert; α , β und FSS nativ waren jeweils ca. 1 mg/ml (Durchführung siehe exp. Teil).
1: Anti- α -IgG "neutralisiert" (10 mg Anti- α -IgG + 50 μ g β -Untereinheit in einem ml, 25 Stunden, 0° C, 6 Min. bei 10 000 g zentrifugiert, der Überstand wurde eingesetzt;
2: α -Untereinheit;
3: β -Untereinheit;
4: FSS nativ.

an, daß im Komplex weniger antigene Determinanten der Unter-
einheit α für ihre Antikörper zugänglich sind als im disso-
ziierten Antigen (96). Die Sporne sind in Abb. 32 D mit
Pfeilen gekennzeichnet.

V 2 Hemmverhalten

Einer weiteren Charakterisierung der IgG sollte die Unter-
suchung ihres Hemmverhaltens gegenüber nativer FSS bezüglich
der Teilaktivitäten dienen. Hierzu wurden die Proben schritt-
weise bis zum Präzipitationspunkt mit steigenden Mengen der
jeweiligen IgG inkubiert und die Aktivität der genannten
Teilreaktionen bestimmt. Als 100 %-Werte dienten Inkuba-
tionen mit der gleichen Menge an gereinigtem Kontroll-IgG.
Da sich beim Nachimpfen der Tiere über ein Jahr zwar nicht
das Präzipitationsverhalten und die Spezifität, jedoch das
Hemmverhalten der Antikörper geändert hat, werden hier zwei
Chargen von Antikörpern beschrieben:

Charge 1 (ca. 12 - 18 Wochen nach der ersten Impfung).

Die Anti- α -Antikörper hemmten die Gesamtreaktion nur un-
wesentlich, nämlich auf ca. 90 % der Ausgangsaktivität.
Die Anti- β -Antikörper hemmten die Gesamtreaktion auf ca.
50 % der Ausgangsaktivität. Als einzige Teilreaktion
wurde die Malonyl-Palmityl-Transferase ebenfalls auf ca.
50 % der Ausgangsaktivität gehemmt.

Damit verhielten sich die Anti- β -IgG qualitativ so wie
die Antikörper gegen das Gesamtzym, wie Hess sie charak-
terisiert hatte (92). Diese Charge ist zu den in Kapitel
VI beschriebenen Experimenten verwendet worden.

Charge 2 (11 - 14 Monate nach der ersten Impfung, mit drei- wöchentlicher Nachimpfung).

Ihr Hemmverhalten ist der Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10 Überblick über das Hemmverhalten der Charge 2

Teilaktivität	Hemmung auf % der Ausgangsaktivität	
	Anti- α -IgG	Anti- β -IgG
Gesamtreaktion	20	45
Acetyltransferase	100	69
Malonyl-Palmityl- Transferase	100	35
1. Reduktase	53	100
2. Reduktase	110	100
Dehydratase	100	100
Kondensation	85	100

Im Laufe der Zeit haben die Kaninchen also zusätzliche Antikörper gebildet.

Die Gesamtaktivität wird durch Anti- α -Antikörper stärker gehemmt als die 1. Reduktion. Andere Aktivitäten werden von diesem Antikörper nur unwesentlich gehemmt. Dies erscheint widersprüchlich, jedoch kann man nicht ausschließen, daß Anti- α -Antikörper auch so am Komplex binden, daß zwar keine weitere Teilreaktion gehemmt wird, wohl aber das für die Gesamtaktivität notwendige Zusammenspiel der Teilreaktionen.

VI Elektronenmikroskopische Untersuchungen mit den Antikörpern gegen die Untereinheiten α und β

Die in Kapitel V charakterisierten Antikörper I wurden nun zu einer Strukturuntersuchung der FSS herangezogen. Ziel war es, die Bindungsorte der Fab-Teile der Antikörper gegen die Untereinheiten α und β am nativen Komplex im Elektronenmikroskop zu lokalisieren. Damit sollte eine Aussage über Lage und Verteilung der Untereinheiten im Komplex möglich sein. Ähnliche Untersuchungen sind in großem Umfang bereits an E.coli-Ribosomen mit Antikörpern gegen deren isolierte Untereinheiten durchgeführt worden und haben zur Erstellung eines Modells des E.coli-Ribosoms beigetragen (97, 98).⁺

VI 1 Anreicherung von FSS-IgG-FSS-Komplexen

Um das Auffinden von FSS mit gebundenen Antikörpern in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu erleichtern, schien es sinnvoll, den nativen Komplex mit Antikörpern zu verbrücken. Durch die drastische Erhöhung des Molekulargewichts solcher verbrückter FSS sollte auch die Isolierung von FSS-IgG-FSS-Komplexen erleichtert sein. Deshalb wurde native FSS mit nicht-präzipitierenden Mengen an jeweiligen Immunglobulin inkubiert und einer Rohrzuckerdichtegradienten-Zentrifugation unterworfen. In Abb. 35 sind die Elutionsprofile solcher Gradienten dargestellt. FSS, die mit Kontroll-IgG inkubiert war, zeigte einen Gipfel, der dem Wanderungsverhalten von nativem Enzym entsprach, und einen zweiten, langsameren, der den Immunglobulinen zugeordnet werden kann (Abb. 35, A). Bei den Ansätzen mit Anti-FSS-IgG (B), Anti- α -IgG (C) und Anti- β -IgG (D) jedoch trat zusätzlich zu den genannten Gipfeln jeweils noch ein weiterer kleiner Gipfel auf, der schneller sedimentierendem Material entsprach. Von diesem

⁺) Herrn Dr. Tischendorf, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin, bin ich für hilfreiche Diskussionen zu großem Dank verpflichtet.

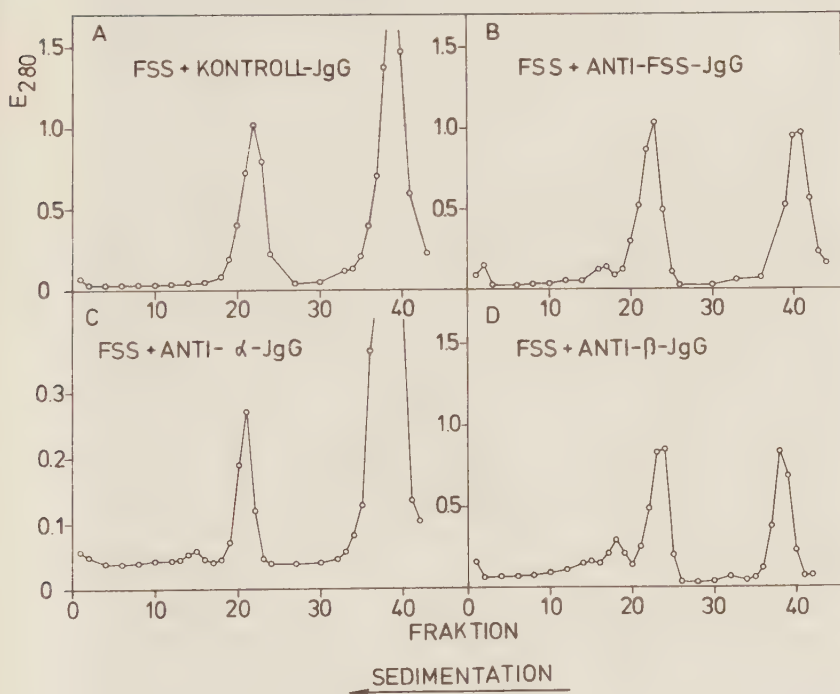


Abb. 35

Rohrzuckergradientenzentrifugation von (A) FSS + Kontroll-IgG, (B) FSS + Anti-FSS-IgG, (C) FSS + Anti- α -IgG und (D) FSS + Anti- β -IgG. Native FSS wurde mit nicht präzipitierenden Mengen an jeweiligen IgG versetzt und auf Rohrzuckerdichtegradienten (SW-27-Becher, 10 - 40 % Rohrzucker) 15 Stunden bei 25 000 UpM und 2°C zentrifugiert. (Durchführung s. exp. Teil).

schneller sedimentierenden Material wurde angenommen, daß es sich um FSS handelte, die mit Antikörpern verbrückt war.

VI 2 Elektronenmikroskopische Untersuchung von FSS-IgG-FSS Komplexen⁺⁾

Die Abbildungen 36 und 37 zeigen einen elektronenmikroskopischen Vergleich von nativer FSS und von schneller wanderndem Material aus der Inkubation FSS + Anti-FSS-IgG (Abb. 35, B, Fr. 16).

Die native FSS erscheint nach negativer Anfärbung mit Phosphorwolframsäure als Ellipsoid mit einer Längsachse von ca. 250 Å und einer Querachse von ca. 200 Å (99). Entlang dieser Querachse zieht sich ein dichter Proteinring. Vergleicht man das Enzym mit einem Globus, findet man einen Äquator (zentraler Ring) und zwei Pole (die beiden Enden des Ellipsoids an seiner Längsachse). Das Molekül scheint Löcher in seiner Oberfläche zu haben, in die die Phosphorwolframsäure eingedrungen ist. Eine Aggregationsneigung von Molekülen untereinander ist, zumindest bei dieser Konzentration (0.03 - 0.1 mg/ml) nicht zu erkennen. Die Moleküle sind statistisch über die Fläche der Aufnahme verteilt.

Im Gegensatz dazu erscheinen die FSS-Moleküle des schneller wandernden Materials der Anti-FSS-FSS Inkubation im Bild als deutliche dimere und oligomere Grüppchen. Eine Verbrückung mit IgG hatte also stattgefunden.

Nun wurde Protein aus den schneller wandernden Gipfeln der Inkubationen FSS + Anti- β -IgG und FSS + Anti- α -IgG bei höherer Vergrößerung untersucht. Abb. 38 gibt einen Überblick über typische Dimere und Oligomere, wie sie nach

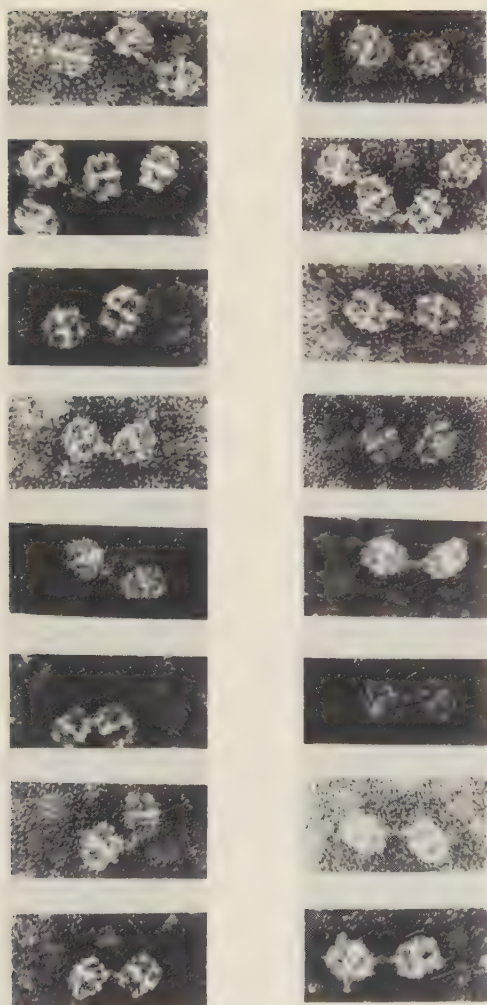
^{+) Herr Dr. E. Siess, Forschergruppe Diabetes, München, hat die elektronenmikroskopischen Aufnahmen angefertigt. Dafür bin ich ihm zu großem Dank verpflichtet.}



Abb. 36 Elektronenmikroskopische Aufnahme nativer FSS.
Negative Anfärbung mit Phosphorwolframsäure.
Vergrößerung ca. X 200 000 (Einzelheiten s.
exp. Teil)



Abb. 37 Elektronenmikroskopische Aufnahme von schneller wanderndem Material (Abb. 35 B) aus der Inkubation FSS + Anti-FSS-IgG (Durchführung s. Abb. 36 und exp. Teil).



— — —
500 Å

Abb. 38 Elektronenmikroskopische Aufnahme von schneller wanderndem Material aus der Inkubation FSS + Anti- β -IgG (Abb. 35). Vergrößerung ca. X 360 000. Übersicht über typische Antikörper-verbrückte FSS-Moleküle. (Durchführung s. exp. Teil).

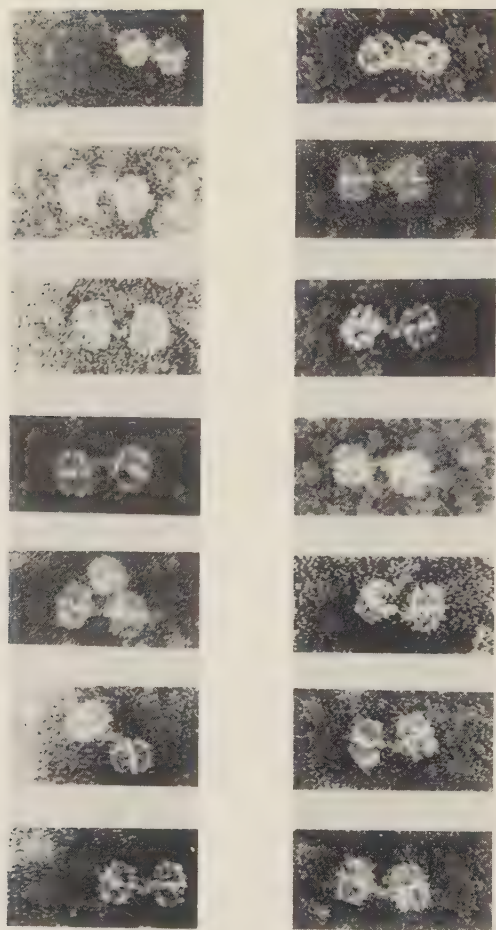


Abb. 39 Elektronenmikroskopische Aufnahme von schneller war-
 derndem Material aus der Inkubation FSS + Anti- α -
 IgG (Abb. 35 C). Vergrößerung ca. X 360 000, Übersicht über
 typische Antikörper-verbrückte FSS-Moleküle. (Durch-
 führung s. exp. Teil).

Behandlung der nativen FSS mit Anti- β -Antikörpern gefunden wurden. Man erkennt, daß die IgG bevorzugt auf der Fläche einer Kappe binden, die die Pole des Komplexes bis etwa zur Mitte jeder Halbkugel hin bedeckt. An der zentralen Ringzone wird keine Bindung beobachtet ($< 2\%$ bei 150 Dimeren).

Anders verhält es sich bei der Bindung von Anti- α -Antikörpern: Hier befindet sich der Angriffspunkt der IgG ganz bevorzugt an der zentralen Ringzone und nicht an der Peripherie des Komplexes ($< 7\%$), wie ein Überblick über Anti- α -IgG verbrückte Gruppen zeigt (Abb. 39).

Ausgewertet wurden jeweils nur FSS-Gruppen, die ein deutlich sichtbares IgG-Molekül als Brücke zwischen den FSS-Molekülen zeigten. Es waren auch andere Gruppen zu beobachten, die keine solche Brücke zeigten, und in manchen dieser Dimeren und Oligomeren lagen die Komplexe viel dichter beieinander, als es einem Abstand entspräche, der durch eine IgG-Brücke verursacht wird. ($\sim 140-100 \text{ \AA}$ (100)).

Als Erklärung hierfür könnte man sich vorstellen:

1. IgG binden auf der dem Betrachter abgewendeten Seite. Im Fall eines zu kleinen Abstandes der FSS-Moleküle binden IgG von Molekülmitte zu Molekülmitte, schematisch



im Gegensatz zu



und die Immunoglobuline sind schlecht oder gar nicht sichtbar.

2. Die Fab-Teile mancher Antikörper dringen durch Löcher in der Oberfläche des Komplexes ins Innere des Moleküls ein und binden intern. Schematisch:



Auch in diesem Fall wäre IgG als Brücke schlecht sichtbar, und ein solches Verhalten könnte ebenfalls zu kleine Abstände zwischen einzelnen Molekülen in den Oligomeren erklären. Die Richtigkeit der genannten Annahmen konnte aber bisher nicht überprüft werden.

Zusammenfassende Diskussion zu Kapitel VI

Ein Raummodell der FSS (101).

Durch Inkubation von nativer FSS mit spezifischen Antikörpern gegen die Untereinheiten α und β und anschließender Rohrzuckerdichtegradienten-Zentrifugation wurden IgG-verbrückte FSS-Dimere und -Oligomere angereichert. Die IgG-Brücken konnten im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden, und damit die Bindungsorte der Antikörper auf der Oberfläche des Enzymkomplexes. Diese Bindungsorte entsprechen der Lage der jeweiligen Antigene im Komplex.

Anti- β -Antikörper binden auf einer Fläche, die etwa eine Kappe über jedem Pol bis zur Mitte der Halbkugel bedeckt, schematisch die schraffierten Flächen in Abb. 40 A.

Anti- α -Antikörper binden an einer Fläche, die einem Gürtel um den Äquator des Komplexes entspricht. Diesen Gürtel bildet eine auffällig dichte Proteinzzone, schematisch die schraffierte Fläche in Abb. 40 B.

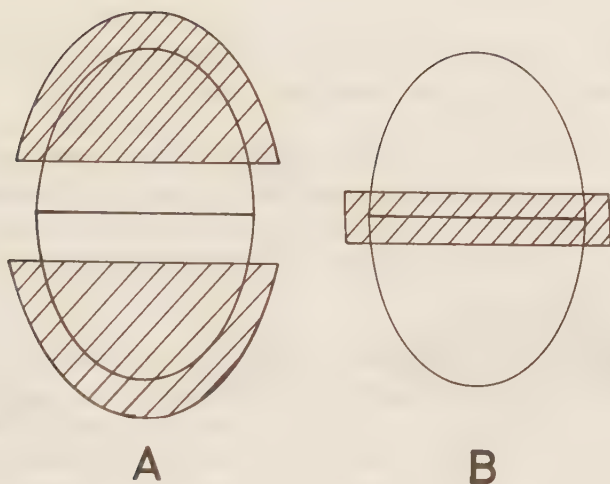


Abb. 40 Schematische Darstellung der Bindungsorte (schraffierte Flächen) der Anti- β -Antikörper (A) und der Anti- α -Antikörper (B) an FSS.

Das häufigere Vorkommen von β -Typ-Bindung in den FSS-Anti- α -IgG-Ansätzen ($< 7\%$ gegenüber $< 2\%$ α -Typ in FSS-Anti- β -IgG-Ansätzen) führen wir auf die etwas geringere Spezifität der Anti- α -Antikörper zurück. Obwohl diese IgG-Fraktionen mit reinem β -Polypeptid "neutralisiert" worden waren, kann man einen Rest an Kontamination der Anti- α -IgG mit freiem Anti- β -IgG nicht ausschließen.

Anti- β -IgG zeigten, entsprechend ihrer hohen Spezifität, weniger als 2% α -Typ-Bindung.

Für den Aufbau des Komplexes muß man eine Stöchiometrie von 6 α - und 6 β -Untereinheiten annehmen. Dafür spricht:

1. Das Coenzym FMN (gebunden an Polypeptid β) (89,102) kommt 5 bis 6 Mal pro Komplexmolekül vor.
2. Die prosthetische Gruppe 4'Phosphopantethein des ACP

(integriert in Polypeptid α) kommt ebenfalls zwischen 5 und 6 Mal pro Komplexmolekül vor (103,75).

3. Ein Vergleich der Molekulargewichte der Untereinheiten und des Gesamtzyms ergibt eine recht gute Übereinstimmung für 6 α und 6 $\beta = 2.19 \times 10^6$ mit dem durch Ultrazentrifugation bestimmten Molekulargewicht von 2.3×10^6 (5).
4. Ein Flächenvergleich der beiden Gipfel in Kap. IV, Abb. 25, legt ein 1:1-Verhältnis der Untereinheiten nahe. Auch weicht die normierte Aminosäurezusammensetzung für einen aus 6 α - und 6 β -Untereinheiten berechneten Komplex von den für Gesamt-FSS gefundenen Werten nur wenig ab. (Kap. IV, Tab. 7).
5. Die beiden Proteine werden nach Auftrennung in der Harnstoffgelelektrophorese im denaturierten Zustand von Coomassie G-250 ähnlich intensiv angefärbt (vgl. Kap. III, Abb. 16 unten).

Zur Raumstruktur der FSS liegen Daten aus Röntgenkleinwinkelstreuungsuntersuchungen vor (104). Diese bestätigen den ersten Eindruck aus der Elektronenmikroskopie, daß es sich bei dem Molekül um einen ellipsoiden Hohlkörper mit Löchern in seiner Oberfläche handelt, der durch eine Wand in zwei Hälften geteilt ist. Die Anwendung dreidimensionaler Elektronenmikroskopie, durchgeführt vom Arbeitskreis um Hoppe (105), konnte das Vorhandensein eines Hohlkörpers mit einer Trennwand entlang des "Äquators" bestätigen. Zudem wurde gefunden, daß die Trennwand recht dicht strukturiert ist, und eine 3,2-Symmetrie wurde für den ellipsoiden Hohlkörper vorgeschlagen.

Will man nun die oben erwähnten analytischen Daten mit den bisher bekannten Strukturmerkmalen verbinden, kann man annehmen, daß der Komplex aus 6 α - und 6 β -Untereinheiten

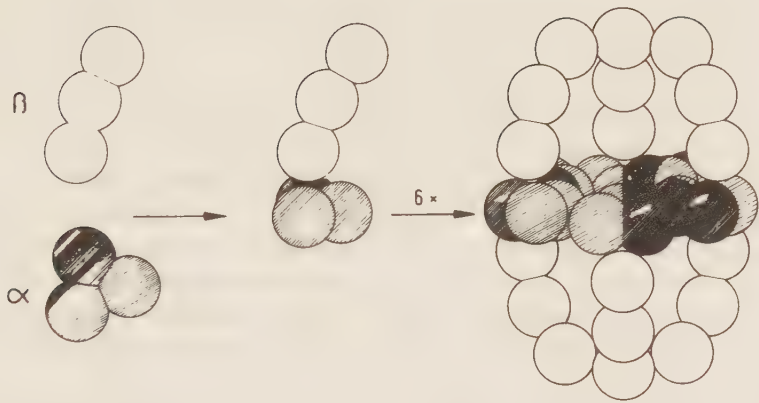


Abb. 41 : Schematisches Modell zum Aufbau der FSS

zusammengesetzt ist. Eine α - und eine β -Untereinheit bilden ein Dimeres. Sechs dieser Dimere treten so zusammen, daß alle sechs Untereinheiten eines Typs miteinander binden. Diese bilden eine hexagonale Basisplatte. Die Bindung dieser sechs gleichen Untereinheiten erfolgt durch Wechselwirkung gleicher Bindungsstellen miteinander. Diese Bindungsstellen sind in der schematischen Abb. 41 schwarz und schraffiert gekennzeichnet. Eine solche Zusammenlagerung führt dazu, daß nun von jeder zweiten Untereinheit, die zur Basisplatte beiträgt, eine Untereinheit des anderen Typs nach oben zeigt, und, um 60° versetzt, von jeder zweiten Untereinheit aus der Basisplatte eine Untereinheit des anderen Typs nach unten ragt. Der entstehende Körper genügt der vorgeschlagenen 3,2-Symmetrie: Dreimaliges Drehen um 120° um die Längsachse und zweimaliges Drehen um 180° um die Querachse resultiert jedesmal in einem identischen hohlen Rotationsellipsoid.

Auf Grund der elektronenmikroskopischen Ergebnisse mit den Anti- α - und Anti- β -IgG muß man annehmen, daß es die α -Untereinheiten sind, die eine hexagonale Basisplatte bilden. Dieses α -Hexamere trennt den Komplex in zwei Hälften, von denen jede aus drei β -Untereinheiten besteht.

Dieses sicher recht grobe Modell stimmt mit allen bisher vorliegenden Daten überein. Auch die Tatsache, daß die isolierte β -Untereinheit unter Reaktivierungsverhältnissen als Monomeres vorliegt, paßt gut zur beschriebenen Lage der β -Untereinheiten im Komplex (vgl. Kap. IV). Von der Untereinheit α könnte man erwarten, daß sie zur Aggregation mit Untereinheiten gleichen Typs neigt. Dies konnte jedoch leider bisher nicht entschieden werden (vgl. Kap. IV). Eine Unterstützung der Modellvorstellung liefert jedoch der immunologische Befund, daß Anti- α -Antikörper zwar mit nativer Fettsäuresynthetase, nicht aber mit dissoziiertem Enzym einen Sporn bilden, was anzeigt, daß α im nativen Komplex

weniger für seine Antikörper zugängliche antigene Determinanten besitzt als im dissoziierten Zustand, also dichter gepackt zu sein scheint. Die recht grobe Lokalisierung der Untereinheiten durch die Bindung ihrer Antikörper läßt vorläufig keine Lokalisierung von Teilenzymen im Komplex zu. Einen Weg zu einer etwas feineren Struktur-Funktionsbeziehung könnten jedoch Versuche eröffnen, die darauf abzielen, durch limitierte Proteolyse in einzelnen Teilreaktionen aktive "Domänen" aus den großen Polypeptiden zu isolieren (68,106). Die Bindungsorte von Antikörpern gegen solche aktiven Bruchstücke am nativen Enzym sollten dann genauere Aussagen über die Verteilung der Einzelenzyme im Komplex erlauben. Versuche zur Isolierung solcher Domänen sind im Lynen'schen Arbeitskreis im Gang.

Ein anderer Ansatz, der vielleicht zu einem weiteren Einblick in die Architektur des Komplexes führen könnte, ist im nächsten Kapitel beschrieben.

VII Vorläufige Versuche zur Isolierung von "Teilkomplexen"

Die in Kapitel II beschriebenen Experimente haben ergeben, daß unter den angegebenen Reaktivierungsbedingungen der Komplexzustand der FSS bevorzugt ist. Untereinheiten-Aggregate, kleiner als der Komplex, traten nicht auf. Um einen weiteren Einblick in die Struktur des Komplexes zu erhalten, wäre es jedoch wünschenswert, Aggregate zu erhalten, die möglicherweise Zwischenzustände beim Zusammen-treten der Untereinheiten zum Komplex darstellten. Beispielsweise könnte dann die Stöchiometrie der Untereinheiten in solchen Aggregaten Hinweise für oder wider die in Kapitel VI beschriebene Modellvorstellung der FSS liefern. Daneben könnten sich auch Hinweise für die Struktur-Funktionsbeziehung im Enzym ergeben, besonders bezüglich der beiden bei allen Dissoziationsmethoden auf Null absinkenden Teilaktivitäten der Kondensation und der 1. Reduktion: Gibt es Zwischenstufen in der Aggregation des Komplexes, die bereits in der Lage sind, die erwähnten Reaktionen zu katalysieren?

Um solche Teilkomplexe zu erhalten, bedienten wir uns wieder der Acylierung der FSS mit DMMA, jedoch wurde bei diesen Versuchen wesentlich kürzer inkubiert und dann mit Lysin-Lösung abgestoppt, und eine Reihe von verschiedenen Puffern wurden zum Umäquilibrieren nach solchen schonenderen Acylierungen eingesetzt.

Eine Inkubationsdauer von 130 - 140 Sekunden bei 0°C und den in Kapitel I beschriebenen Bedingungen und anschließende Gelfiltration in 20 mM K-Phosphat-Puffer, pH 8.5, ergab eine Spaltmischung, deren Sedimentationsverhalten auf Rohrzuckergradienten in Abb. 42 dargestellt ist. Wegen der möglichen Instabilität solcher Teilkomplexe mußte die Zentrifugationsdauer herabgesetzt werden. Dazu bietet sich die Verwendung von Vertikalrotoren an. In diesem System steht der Becher parallel zur Rotor- und Antriebsachse. Dadurch schichtet sich der Gradient beim Anfahren um, und die Trennstrecke wird

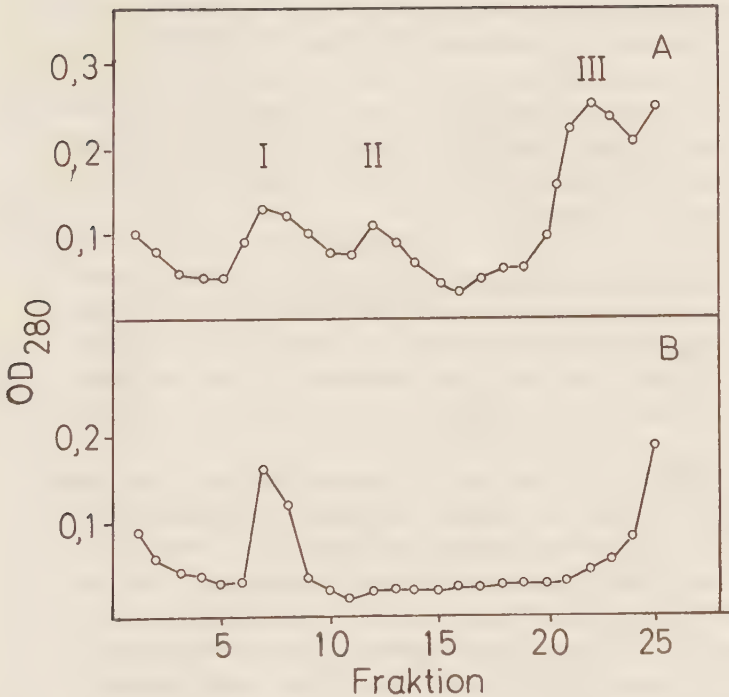


Abb. 42

Rohrzuckerdichtegradienten-Zentrifugation im Festwinkelrotor.
A: FSS-DMMA-Spaltung, 140 Sek. bei 0°C, in 20 mM K-Phosphat pH 8.5, 10 mM 2-Mercaptoäthanol umäquilibriert (Einzelheiten im exp. Teil), ca. 2 mg aufgetragen.

B: FSS nativ in 20 mM K-Phosphat, pH 8.5, 10 mM 2-Mercaptoäthanol.

Gradienten: 6-30 % Rohrzucker, K-Phosphat, 20 mM, pH 8.5, 1 mM DTT. Rotor: Christ 70, Laufzeit 100 Min. bei 70 000 UpM und 3°C.

von ihrer ursprünglichen Länge (etwa Becherlänge) auf eine Strecke entsprechend dem Becherdurchmesser verkürzt (107). Beim Auslaufen des Rotors bildet sich die ursprüngliche Form des Gradienten zurück. Da ein solcher Rotor nicht zur Verfügung stand, benützten wir einen Festwinkelrotor und zentrifugierten für 100 Minuten bei 70 000 UpM. Durch den von 90° abweichenden Winkel ist die Geometrie des Rotors nicht ideal, jedoch konnte auf diese Weise in kurzer Zeit das erwähnte Spaltgemisch grob in drei Gipfel aufgetrennt werden (Abb. 42, Kurve A).

Dieses Verhalten konnte qualitativ auch durch Läufe mit Gradienten in Ausschwingrotoren reproduziert werden, jedoch waren die Laufzeiten viel länger (15 Stunden), und die Ausbeute an Material mit einem Molekulargewicht zwischen dem des Komplexes und dem der Untereinheiten war geringer.

Protein aus Gipfel II der Abb. 42 zeigte ca. 50 % der spezifischen Aktivität der Acetyltransferase, verglichen mit Protein aus Gipfel III. Deshalb versuchten wir die Stöchiometrie der Untereinheiten in Gipfel II durch Spaltung der FSS nach radioaktiver Markierung der Untereinheit α zu bestimmen. α - ^{14}C -CAM-FSS und native FSS wurden parallel den beschriebenen Bedingungen unterworfen und wiederum zentrifugiert, diesmal in SW 41 Rotoren. Der Vergleich der beiden Elutionsprofile ist in Abb. 43 dargestellt. Zu unserer Überraschung ergab sich ein stark unterschiedliches Wanderungsverhalten der beiden Ansätze. ^{14}C -CAM-Spaltansatz zeigte überhaupt keinen Gipfel entsprechend restlichem nativen Enzym mehr, dafür einen größeren Anteil des Gemischs der monomeren Untereinheiten und den bekannten Gipfel mittleren Molekulargewichts. Ein Vergleich der Radioaktivität mit der Absorption bei 280 nm in den Gipfeln zeigt, daß sich die Stöchiometrie in beiden Gipfeln nicht wesentlich unterschied (Abb. 43 B).

Zu unserem großem Erstaunen war Protein aus Gipfel II (Abb. 43 A)

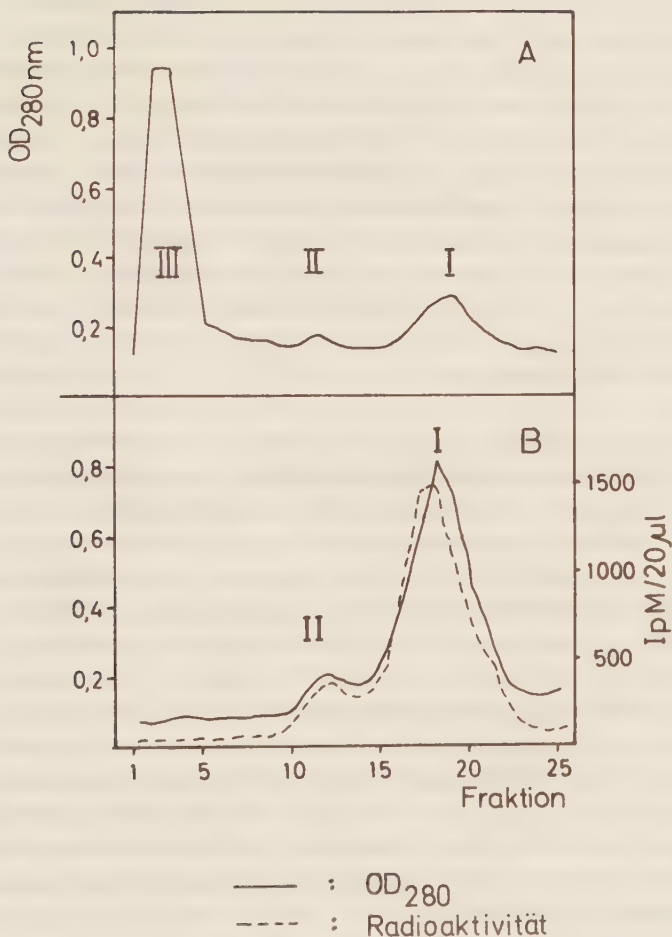


Abb. 43

Rohrzuckerdichtegradienten-Zentrifugation im Ausschwing-rotor.

A: FSS-DMMA-Spaltung, 140 Sek. bei 0°C, in 20 mM K-Phosphat pH 8.5, 10 mM 2-Mercaptoäthanol umäquilibriert (Einzelheiten im exp. Teil), ca. 2.5 mg aufgesetzt.

B: Wie A, jedoch wurde α -¹⁴C-CAM-FSS zur Acylierung eingesetzt, aufgesetzt wurden ca. 2.5 mg.

Rotor SW 41, Gradienten: 50 %iges "Polster", (1.5 ml), dann 10-20 % Rohrzucker, K-Phosphat, 20 mM, pH 8.5, 10 mM 2-Mercaptoäthanol, Zentrifugation für 15 Stunden bei 35 000 UpM und ca. 2-3°C.

in der Lage, sowohl β -Ketoacylreduktase als auch Gesamtreaktion auszuüben. Wir haben keinen Anhaltspunkt dafür, daß diese Aktivitäten auf eine Reaktivierung der FSS in der Küvette beim optischen Test zurückzuführen sind, können dies jedoch nicht ausschließen. Die Tests zeigten jedoch nicht die für Reaktivierungen typischen Anlaufkurven. Die proteinchemische Analyse dieses Materials (etwa nach Fixieren mit Glutaraldehyd) und elektronenmikroskopischen Untersuchungen dieser Fraktionen (unter Einsatz der Antikörper gegen die Untereinheiten α und β) werden Gegenstand weiterer Arbeit sein.

Diskussion zu Kapitel VII

Durch schonende Acylierung kann man Untereinheitenaggregate der FSS mit einem geringeren Molekulargewicht gegenüber dem Komplex isolieren. Diese Aggregate scheinen recht labil zu sein. Es muß noch entschieden werden, ob solches Material wirklich Gesamtaktivität ausüben kann, oder ob es unter den Meßbedingungen in der Küvette reaggregiert. Wenn beim Zusammentreten der Untereinheiten zum Komplex die Bildung von $\alpha\beta$ -Dimeren der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, und die nachfolgenden Strukturen sehr schnell ausgebildet werden, dann muß das Nichtvorhandensein von Anlaufkinetiken im optischen Test in diesem Fall nicht zwangsweise gegen eine Reaggregation zum funktionstüchtigen Komplex erst unter Testbedingungen sprechen. Wir hoffen, diese Frage durch vorsichtiges Fixieren, etwa mit Glutaraldehyd, entscheiden zu können.

Das unterschiedliche Verhalten von ^{14}C -CAM-FSS und nativer FSS nach der beschriebenen schonenden Modifizierung ist ein deutlicher Hinweis auf eine Konformationsänderung der FSS nach Beladung der peripheren SH-Gruppe. Kresze (56) diskutiert eine solche Konformationsänderung nach Übertragung des Acetyl-Rests auf die periphere SH-Gruppe. Ob es sich bei unserem Befund um einen Effekt handelt, der mit dem Mechanismus der Fettsäuresynthese zusammenhängt, soll in weiteren Versuchen durch Beladung des Enzyms mit Substraten vor der Spaltung untersucht werden.

Experimenteller Teil

A: Verwendete Geräte

Ultrazentrifugen Spinco L2-65B, L3-50, L5-65, L3-40
Zentrifugen Sorvall Superspeed RC2
Tischzentrifuge, Christ Superspeed Junior
Mikroliter-Zentrifugen Hettich
Zentrifuge Stock
Zentrifuge WKF G-50K
Zellhomogenisator nach Manton Gaulin
Fraktionskollektor, Säulenchromatographiezubehör der
Firma Serva
Fraktionskollektoren Ultrorac, Redirac, LKB
Isofokussiersäulen 110 ml und 440 ml, LKB
Gleichspannungsspeisegeräte Hölzel, Camag, Buchler, LKB
Schlauchpumpen Varioperpex, Multivarioperpex LKB
Aminosäureanalysator Biotronik mit Philips-Schreiber
PM 8221 und Integrator (System I) von Biotronik
Flüssigkeitszintillationszähler Mark II von Nuclear Chicago
Division
Flüssigkeitszintillationszähler Packard Tri-carb Modell 314
und 544
Radiodünnschichtscanner von Friesseke und Hoepfner
Lyophilisator WKF LO5
pH-Meter, Modell E-500 von Metrohm
Photometer mit Kompensationsschreiber 6511 von Eppendorf
Zeiss Spektralphotometer PQII, PM6 und DMR21
Membranfiltrationsgeräte von Amicon N.V.
Gradientenformgerät Ultrograd, LKB
Analytische Ultrazentrifuge, Spinco Modell E
Waagen Mettler P1210
Mikrowaagen Mettler H35 und Mettler H54
Flachgelelektrophorese-Apparaturen nach Hölzel
Eigenbau
Präparatives Flachgelelektrophoresegerät EC
Präparatives Flachgelelektrophoresegerät Colora

Automatik-Pipetten von Eppendorf, Pipetman, Variopet
UV-Durchflußmonitor LKB Uvicord II mit 2-Kanalschreiber
UV-Durchflußmonitor ISCO mit 2-Kanalschreiber
Photometer Cary
Photometer DBT Beckman
Magnetrührer, Colora; Janke und Kunkel, Heidelberg

B: Enzyme und Chemikalien

Alle käuflichen Enzyme waren von der Firma Boehringer, Mannheim. Serumalbumin vom Rind und Agarose von den Behringwerken, Marburg.
Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid, Phosphozellulose, Natriumdodecylsulfat, Dithiothreitol, Coomassie Brilliant Blue G-250 von Serva, Heidelberg.
DEAE-Cellulose von Whatman
Dowex AGXI und AGXII, Bio-Gel HT von Bio-Rad
Sephadex G25, G50, G75 Superfine, Sepharose CL-6B, CNBr-aktivierte Sepharose 4B, aktivierte Thiolsepharose, CH-Sepharose und AH-Sepharose von Pharmacia, Uppsala.
Ampholine von LKB, Stockholm.
Guanidinhydrochlorid, N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin, Kaliumborhydrid von Schuchardt, München.
Aluminiumoxyd von Alcoa, Arkansas.
2-Mercapto-Äthanol von der Firma C. Roth, Karlsruhe
Komplettes Freund'sches Adjuvans, Difco Laboratories, Detroit.
2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 1,4-Bis-2(5-Phenyloxazol)-benzol (POPOP) von Interchem, München.
Maleinsäureanhydrid, Citraconsäureanhydrid und Dimethylmaleinsäureanhydrid von Fluka, Buchs, und von Schuchardt, München.
Unisolve I von Zinsser, Frankfurt.
Soluene 350, Dimilume und Instagel von Packard Instruments, Frankfurt.
Die Radiochemikalien stammten von den Firmen NEN und The Radiochemical Centre, Amersham.

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien stammten von der Firma Merck, Darmstadt, und waren von der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe.

Harnstoff wurde bei Experimenten, die auf eine Reaktivierung der FSS abzielten, zweimal aus Methanol umkristallisiert; Lösungen wurden nicht aufbewahrt.

Jodessigsäure wurde aus Heptan/Pentan 1:1 umkristallisiert.

Jodacetamid wurde aus Wasser umkristallisiert.

THF wurde über Na getrocknet.

Cysteinlösungen wurden nur für wenige Stunden benützt.

Die Hefe war Bierhefe der Firma Löwenbräu, München.

C: Synthesen

Radioaktives $1\text{-}^{14}\text{C}$ -SDS wurde in Anlehnung an (33) aus $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Dodecanolalkohol und Chlorsulfonsäure hergestellt: $10.1\text{ }\mu\text{Mol}$ ($250\text{ }\mu\text{Ci}$) $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Dodecylalkohol in $800\text{ }\mu\text{l}$ Benzol wurden zu 1.62 g (8.7 mMol) unmarkiertem Dodecylalkohol in 15 ml Äther gegeben. Unter Eiskühlung und Rühren wurden 1.75 g (15 mMol) Chlorsulfonsäure langsam in die Lösung eingetropft. Nach 20 min Rühren im Eisbad wurde weitere 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf Eis gegeben und anschließend mit einer 1 M wässrigen Lösung von Na_2CO_3 neutralisiert. Die wässrige Phase wurde 5 Mal mit je 20 ml n-Butanol extrahiert. Die vereinigten Butanol-Extrakte wurden zu einem Brei eingedampft. Da beim Extrahieren mit n-Butanol salzhaltiges Wasser mit übergegangen war, wurde der weiße Abdampfungsrückstand mit 60 ml Methanol ausgekocht und filtriert. Die methanolische Phase wurde wieder zum weißen Brei eingengt, dieser nach Abkühlen mit 50 ml Diäthyläther digeriert und 10 min bei 15 000 g zentrifugiert. Der weiße Niederschlag wurde einmal aus Wasser und einmal aus Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute: 1.91 g $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Na-Dodecylsulfat
(= $75,8\text{ }\%$ d. Th., bezogen auf eingesetzten Dodecylalkohol).

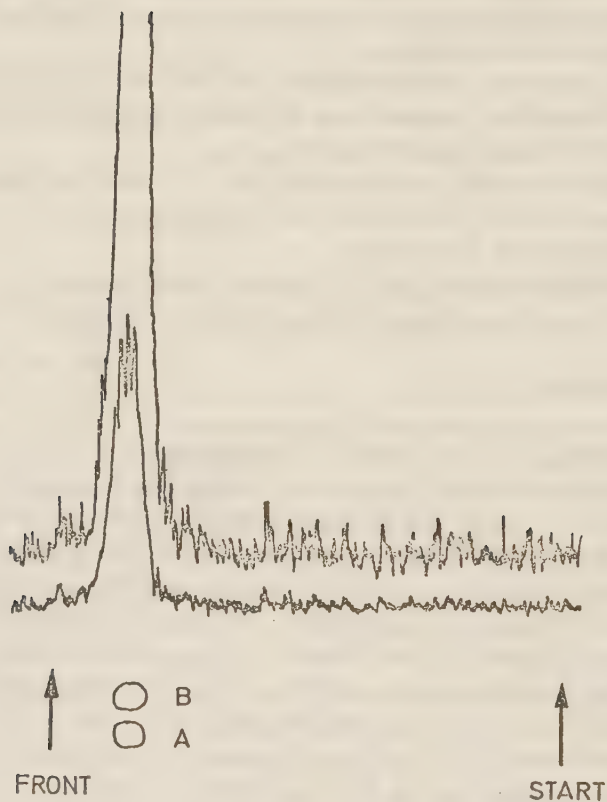


Abb. 44

Radiochromatogramm von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -SDS auf Kieselgel F 254 (Merck),
0.2 mm. Laufmittel Methanol/ H_2O (80/20).

A: $1\text{-}^{14}\text{C}$ -SDS

B: authentisches SDS

Spez. Radioaktivität: 1.83×10^5 Ipm/mg

Auf Kieselgel F254 (0.2 mm-Folie, Merck) läuft das radioaktive Produkt einheitlich und identisch mit einer aus Wasser umkristallisierten Probe von käuflichem SDS (vgl. Abb. 44).

Acetyl-CoA wurde nach (108) hergestellt.

$1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA wurde in Anlehnung an (108) dargestellt, jedoch zuerst das unverdünnte radioaktive Anhydrid zu einem Überschuß an CoA-SH gegeben und nach 10 Min. im Eisbad mit unmarkiertem, überschüssigem Acetanhydrid nachacyliert, bis die Nitroprussidreaktion (109) in einem Aliquot des Ansatzes negativ war.

Malonyl-CoA wurde durch Umesterung von N-Caproyl-S-Malonyl-Cysteamin mit CoA-SH im Unterschuß hergestellt (110).

N-Caproyl-S-Malonylcysteamin wurde nach (110) hergestellt.

$3\text{-}^{14}\text{C}$ -Malonyl-CoA wurde nach (117) in der Modifikation nach (20) und enzymatisch mit Acetyl-CoA-Carboxylase aus Hefe hergestellt und war ein Geschenk von Herrn H. Engeser.

$1\text{-}^{14}\text{C}$ -Palmityl-CoA wurde nach (111) hergestellt und war ebenfalls ein Geschenk von Herrn H. Engeser.

S-Acetylpantethein wurde in Anlehnung an (110) aus Essigsäureanhydrid und Pantethein hergestellt.

Pantethein wurde durch alkalische Verseifung von S-Benzoylpantethein oder durch Reduktion von Pantethein mit Natriumborhydrid nach (112) dargestellt.

β -Hydroxycaproylpantethein wurde nach (113) synthetisiert und von Herrn Th. Schmitt zur Verfügung gestellt.

ϵ -Aminocaproylpantethein-Sepharose wurde nach (43) und (114) hergestellt.

Calciumphosphat-Gel wurde nach (115) hergestellt.

D: Allgemeine analytische Methoden

1. Proteinbestimmung

Für Proteinbestimmungen wurde die Biuret-Methode nach Beisenherz et al. (116) verwendet (Faktor = 8.6 (89)). Verdünnte Proteinlösungen wurden routinemäßig nach der Methode von Warburg und Christian bestimmt (118).

2. Radioaktivitätsmessung

Die ^{14}C -Bestimmungen wurden in Flüssigkeitszintillationszählern durchgeführt (Mark II, Nuclear Chicago und Tri-Carb, Packard).

Toluol-Szintillationslösung:

1 l über basischem Aluminiumoxid chromatographiertes und destilliertes Toluol enthielt 4 g PPO und 250 mg POPOP. Wässrige Lösungen wurden in Unisolve 1 oder Instagel bestimmt.

3. Gehaltsbestimmung von Thioestern

Acetyl-CoA wurde enzymatisch nach der Methode von Buckel und Eggerer (119) bestimmt, Malonyl-CoA im optischen Test für FSS.

ϵ -Aminocaproylpantethein-Sepharose wurde mit 1 M Hydroxylamin (pH 7,0) verseift und anschließend freies Thiol mit der DTNB-Methode bestimmt (49).

4. Gelelektrophoresen

a) Proteinproben im nativen Zustand (native Disk-Elektrophorese) wurden auf Disk-Gelen im System 1 nach Maurer (52) der Elektrophorese unterworfen. Auf das Obergel wurde verzichtet, da es in unseren Untersuchungen keine Verbesserung der Trennschärfe erbrachte. Die zylindrischen Gele waren 0.4 x 6 cm. Die Spannung wurde stabilisiert (250-350 V).

Dadurch ergaben sich Stromstärken zwischen 2 und 3 mA pro Gelröhrchen.

b) SDS-Gelelektrophoresen wurden entweder nach Weber und Osborn (70) in der Modifikation von Schweizer (22) in zylindrischen Gelen (0.6 x 10 cm) oder nach Lämmli in Acrylamidgradienten-Flachgelen durchgeführt. Gradient an Acrylamid: 15-5 %, darauf wurde ein 3.4 %iges Taschen-gel polymerisiert (80). Bei den zylindrischen Gelen wurde im Gegensatz zu (22) bei einer Stromstärke von ~6 mA pro Gelröhrchen gearbeitet und die Ammoniumperoxodisulfatlösung hatte nur eine Konzentration von 17.5 mg/ml. Bei Gradienten-flachgelen wurde mit einer stabilisierten Spannung von 120-150 V gearbeitet. Die Laufzeiten betrugen in beiden Fällen 7 bis 12 Stunden.

Die Harnstoff-Gelelektrophorese ist in der Beschreibung zu Kapitel III aufgeführt.

Nach beendetem Lauf wurden die Gele, wie in F 3 a beschrieben, angefärbt und entfärbt.

E: Isolierung von FSS

Die Anreicherung der FSS erfolgte aus Bierhefe der Löwen-brauerei, München, nach der Vorschrift von Lynen (120), modifiziert nach Oesterhelt (117) und Schreckenbach (121). Es wurde Hefe aus dem späten logarithmischen Wachstums-stadium verwendet.

Kurz vor dem Aufschluß der Zellen wurde den Hefesuspensionen der Serin-Proteasen-Inhibitor Phenylmethansulfonyl-fluorid bis zu einer Konzentration von 1 g/l zugegeben. Aus 10 kg abzentrifugierter, feuchter Bierhefe wurden zwischen 4000 und 8500 E FSS erhalten, das sind 1,5-3 g Enzym mit spezifischen Aktivitäten zwischen 2500 und 3500 mE/mg. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im Standard-

Enzymtest. Im Küvettenvolumen 1 ml waren enthalten: 100 μMol K-Phosphat, pH 6.5, 1 μMol Dithiothreit, 0.2 mg Rinderserumalbumin, 0.08 μMol Acetyl-CoA, 0.2 μMol NADPH und 4 bis 8 μg FSS. Nach Verfolgen des Blindlaufes für 2 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.1 μMol Malonyl-CoA gestartet. Meßgröße war die Änderung der Extinktion bei 334 nm bei 25°C. ϵ_{NADPH} bei 334 nm = 6.18×10^6 (122).

1 Einheit (E) ist die Menge FSS, die unter Testbedingungen 2 μMol NADPH pro Minute umsetzt. Dies entspricht der vollständigen Reduktion eines C_2 -Bausteines (1 Malonyl-Rest).

Das Enzym wurde als Ammoniumsulfat-Präzipitat (90 % der Sättigung an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) in 0.1 M K-Phosphat-Puffer, pH 6,5 1 mM DTT, 0.5 mM K-EDTA bei -18°C aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen waren über Monate hinweg nur geringe Aktivitätsverluste zu beobachten.

F: Versuchsbeschreibungen

1. Zu Kapitel I 1 Dissoziationsbedingungen

FSS (durch Ultrazentrifugation entsalzt) wurde in Spalt-puffer mit einer Konzentration zwischen 5,5 und 6.5 mg/ml vorgelegt. Spaltpuffer = 0.3 M K-Phosphat, pH 7.5, 10 mM 2-Mercaptoäthanol. Unter Rühren im Eisbad wurden CA oder DMMA zugegeben (13 μl einer 0.8 M Lösung an CA oder DMMA in THF, wasserfrei) bis zu einer Endkonzentration von 10 mM. Wurde die Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten abgestoppt, erfolgte dies durch Zugabe eines Zehntel Volumens an 2 M Lysinhydrochloridlösung, die mit NaOH auf pH 8.0 eingestellt war.

Standardspaltansätze wurden ohne Lysin-Zugabe 30 min bei 0°C inkubiert.

2. Zu Kapitel I 2 Analytische Ultrazentrifugation

a) Die analytischen Ultrazentrifugationen wurden bei $1-2^{\circ}\text{C}$ und 59 760 UpM durchgeführt. Als interner Standard lief in "wedge"-Zellen native FSS mit. Das native Enzym lag im gleichen Puffer vor wie die Spaltansätze. Um die Verhältnisse der nativen Synthetase den Spaltansätzen anzugleichen, wurden dem nativen Enzym jeweils $10\text{ }\mu\text{Mol}$ Citraconsäure pro ml und $13\text{ }\mu\text{l}$ THF/ml zugesetzt.

b) Standard-Spaltansatz nach Umäquilibrieren
Standard-Spaltansätze (F,1) wurden nach 30 min Inkubation bei 0°C im Kühlraum ($4-5^{\circ}\text{C}$) durch Gelfiltration über Sephadex G50 in 20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 1 mM DTT oder 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0, 1 mM DTT umäquilibriert. Die Bettvolumina der Säulen betragen mindestens das Zehnfache der Probenvolumina.

Bei den UZ-Läufen lag das native Vergleichsenzym ebenfalls in 20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 1 mM DTT oder 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0, 1 mM DTT vor.

Nach Erreichen der Endgeschwindigkeit wurden zu verschiedenen Zeitpunkten fotografische Platten belichtet. Der apparative S-Wert des nativen Enzyms wurde ermittelt. Der aus der Literatur bekannte Wert $S_{20W} = 40$ wurde durch den apparativen gefundenen Wert geteilt. Dieser Quotient ergab den Korrekturfaktor für die Korrektur der apparativen S-Werte der Spaltstücke auf S_{20W} .

Dieses Verfahren erlaubte eine breite Variation der Bedingungen, da die Berechnung der S_{20W} -Werte unabhängig von Tabellenwerten erfolgen konnte. Zusätzlich eliminierte dieses Vorgehen apparative Fehler, wie sie zum Beispiel bei der Messung der Rotortemperatur während der Läufe auftreten.

Zur Verwendung kam der Rotor AN-D und Aluminiumzellen.

3. Zu Kapitel I 3 Analytik der Spaltgemische nach spez. radioaktiver Markierung der Untereinheit α

a) Radioaktive Markierung der α -Untereinheit

Zur radioaktiven Markierung der α -Untereinheit bedienten wir uns des von Kresze angegebenen Verfahrens (57). Ein Aliquot einer CH_2Cl_2 -Lösung von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -IAM (spez. Radioaktivität 57 und 60 $\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$) wurde in ein Reagenzglas überführt, und das Lösungsmittel mit Stickstoff verblasen. Im Eisbad wurde FSS (30-60 mg/ml, in thiolfreiem K-Phosphat-Puffer, pH 6.5, 0.1 M) in einem solchen Volumen zum getrockneten $1\text{-}^{14}\text{C}$ -IAM gegeben, daß die Endkonzentration an IAM zwischen 0.4 und 1 mM war. Die erste Minute der Inkubation wurde vorsichtig geschüttelt. Nach einer Stunde bei 0°C war die Aktivität der Gesamtreaktion auf $<10\%$ abgesunken, und die Ansätze wurden durch Gelfiltration an Sephadex G50 in Standardspaltpuffer überführt und dabei gleichzeitig von überschüssigem $1\text{-}^{14}\text{C}$ -IAM befreit ($4\text{-}5^\circ\text{C}$). Beladungen: zwischen 2.5 und 3.3 Mol $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Carboxamidomethylrest pro Mol FSS. Die Durchführung der nativen Diskelektrophorese ist in D 4 a beschrieben.

b) Radioaktivitätsbestimmung in den Gelen

Nach beendetem Lauf wurden die Gele angefärbt (0.25 % Coomassie Brilliant Blue G-250 in Methanol/Essigsäure/Wasser, 50:7:43, 1 Stunde, Raumtemperatur) und über Nacht entfärbt (Methanol/Essigsäure/Wasser, 10:7:83). Die entfärbten Gele wurden in Trockeneis-Aceton gefroren und in 14 bis 20 gleiche Scheibchen zerschnitten. Diese Fraktionen wurden mit 1 ml Soluene 350 und 100 μl H_2O mindestens 2 Stunden bei 40°C inkubiert. Darauf wurden 10 ml Dimilume 30 zugegeben und nach frühestens 30 min im Flüssigkeitsszintillationszähler die Radioaktivität bestimmt.

4. Zu Kapitel I 4 Bestimmung freier Aminogruppen

Die Bestimmung erfolgte im wesentlichen nach Habeeb (60). Native FSS und Standardspaltansätze wurden durch Gelfiltration

über Sephadex G50 mit 0.02 M K-Phosphat-Puffer, pH 8.5, äquibriert. Aliquote dieser Proben wurden bis zu einem Endvolumen von 1 ml mit 20 mM K-Phosphat-Puffer, pH 8.5, versetzt und wie folgt inkubiert: 1 ml 4 %ige NaHCO_3 Lösung pH 9.0 (mit NaOH), + 1 ml 0.1 %ige wässrige TNBS-Lösung; 2 Stunden, 40°C . Anschließend wurden jeweils 1 ml 10 %ige wässrige SDS-Lösung und 0.5 ml einer 1 N HCl zugegeben und vorsichtig geschüttelt, um ein Übersäumen bei der CO_2 -Bildung zu vermeiden. Fand keine Gasentwicklung mehr statt, wurde im Photometer bei 335 nm gegen einen Ansatz vermessen, der anstatt Proteinlösung nur Puffer enthielt. Als Bezugsgröße dienten Lysin- und ϵ -Aminocapronsäure-Eichkurven, unter den gleichen Bedingungen aufgenommen (1 Mol Lys $\hat{=}$ 2 Mol $-\text{NH}_2$).

Alle Lösungen wurden frisch hergestellt und nur am gleichen Tag verwendet.

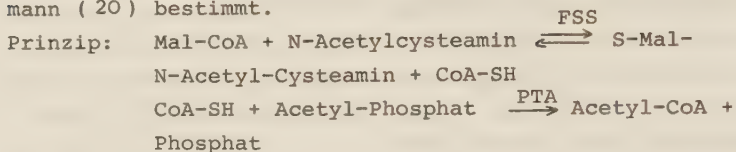
Es ergab sich ein molarer Extinktionskoeffizient von $1.05 \times 10^4 \left[\frac{\text{cm}^2}{\mu\text{Mol}} \right]$.

5. Zu Kapitel I 5 Teilaktivitäten nach Standardspaltung mit CA und DMMA

Nach der Standardspaltung wurden die Ansätze an Sephadex G50 in Tris/HCl 0.02 M, pH 7.5, 1 mM DTT chromatographiert und Aliquote dieser umäquibrierten Proben zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt. Als 100 %-Bezugswerte dienten die spezifischen Teilaktivitäten nativer FSS, die ebenfalls in oben genannten Puffer umäquibriert worden war.

- a. Acetyltransferase wurde im optischen Test nach Weithmann (20) mit Malatdehydrogenase und Citratsynthase bestimmt. Es wurde die doppelte Menge an Acetyl-CoA gegenüber (20) eingesetzt. Unter diesen Bedingungen zeigte sich eine lineare Proteinabhängigkeit der Aktivität zwischen 3 und 25 μg eingesetzter FSS.

- b. Malonyltransferase wurde im optischen Test nach Weithmann (20) bestimmt.



Die Zunahme der Extinktion bei 233 nm (entsprechend der Bildung von Acetyl-CoA) erfolgt proportional der eingesetzten Enzymmenge zwischen 5 und 20 µg FSS.

- c. Dehydratase wurde im optischen Test nach (72) bestimmt. In Abänderung dieser Vorschrift wurde nach Schmitt (123) S-β-Hydroxybutyryl- oder S-β-Hydroxycaproylpantethein eingesetzt. Die Verwendung dieser Pantetheinderivate anstelle der N-Acetyl-Cysteaminderivate erlaubt den Einsatz wesentlich geringerer Enzymmengen, da die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion mit diesen Derivaten etwa um den Faktor 500 größer ist.
- d. Enoyl-Reduktase wurde im optischen Test nach (124) bestimmt. (Diaphorase-Test).
- e. β-Ketoacylsynthetase wurde nach (3,19) im radioaktiven Test bestimmt ($^{14}\text{C-CO}_2$ -Carboxylierung von S-Acetoacetyl-N-Acetylcysteamin unter Spaltung und Bildung von Acetyl-CoA und S- ^{14}C -Malonylpantethein).
- f. β-Ketoacylreduktase wurde im optischen Test nach (3,72) bestimmt.
6. Zu Kapitel II 1 Saure Hydrolyse der Protein-ε-Aminolysinamide

Die Proben wurden 1:1 mit 2 M Tris-Acetat, pH 8.1, verdünnt. War hiernach die Proteinkonzentration kleiner als 0.5 mg/ml, wurde Rinderserumalbumin bis zu dieser Konzentration zugegeben. Solche Ansätze wurden vorsichtig mit gesättigter Ammonium-

sulfat-Lösung, die mit Schwefelsäure auf pH 2.0 eingestellt war, bei Raumtemperatur an einer Glaselektrode auf pH 4.6 titriert. Bereits ab etwa pH 7.5 war ein Ausflocken von Protein zu beobachten. Nach Erreichen des End-pH (ca. 6 - 10 Minuten) wurde weitere 30 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann abzentrifugiert (30 Minuten, 30 000 g). Der Niederschlag kann ohne deutliche Einbußen der Reaktivierungsausbeuten über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt werden. Er löst sich gut in Phosphatpuffern, pH 6.5 - 8, jedoch schlecht in Trispuffern.

7. Zu Kapitel II 2 Reaktivierungsbedingungen

Die Niederschläge (F 6) wurden in Reaktivierungspuffer aufgenommen. Reaktivierungspuffer: K-Phosphat 0.1 M, pH 7.5, 10 mM DTT, 0.5 mM K-EDTA, 10 μ M FMN, 0.1 mg Rinderserumalbumin, pro ml, wahlweise. Anschließend wurden Reste von Ammoniumsulfat durch Gelfiltration an Sephadex G50 im gleichen Puffer abgetrennt (alles 0-4°C). Reaktivierung: 1 - 2 mg Protein/ml, 25°C.

8. Zu Kapitel II 3 Analytik der Reaktivierung

- a. Zur Disk-Elektrophorese wurden die Proben 1:1 mit 60 %iger Rohrzuckerlösung verdünnt und auf die Gele aufgetragen. Als Markerfarbstoff wurden dem Kathodenpuffer 10 μ l einer 0.1 %igen Bromphenolblaulösung zuge-mischt. Die Gele waren 5 und 3.4 %ig an Acrylamid. Durchführung wie in D 4 a beschrieben.
- b. Zur analytischen Ultrazentrifugation wurden die Niederschläge von F 6 in weniger Reaktivierungspuffer aufgenommen. Nach Gelfiltration an Sephadex G50 lagen die Proteinkonzentrationen um 3 mg/ml. FSS nativ als interner Standard wurde wie die Reaktivierungsansätze behandelt. Durchführung der Läufe wie in F 2.

9. Zu Kapitel II 4 Reaktivierungsverhalten von Teilreaktionen

Die Ammoniumsulfatniederschläge (vgl. F 6) wurden im Reaktivierungspuffer aufgenommen (0°C) und bei 4° an Sephadex G50 in Reaktivierungspuffer von Ammoniumsulfat befreit. Die Messungen zum Zeitpunkt 0 erfolgten beim Start der Inkubation bei 25°C . Die Aktivitäten der Teilreaktionen wurden zu den verschiedenen Zeitpunkten in Aliquoten der Inkubationen wie in F 5 beschrieben, durchgeführt.

Zur Bestimmung der Enoylreduktaseaktivität wurden Aliquote der Inkubationen 3 Minuten vor jeder Messung durch Chromatographie in einem Säulchen (Pasteurpipette) an Sephadex G50 in Reaktivierungspuffer ohne DTT von DTT befreit. Dies war notwendig, weil das überschüssige Thiol den Farbstoff Dichlorphenolindophenol nicht-enzymatisch reduziert.

10. Zu Kapitel III Entwicklung eines analytischen Gelelektrophoresesystems

Allgemeines Vorgehen:

Die Proteinlösungen ($60\text{ }\mu\text{g/ml}$ bis 15 mg/ml) wurden mit einem doppelten Volumen an Denaturierungspuffer versetzt. Denaturierungspuffer: 7 M Gu/HCl , 0.7 M TEA/HCl , mit NaOH auf pH 8.4 eingestellt, $0.12\text{ M 2-Mercaptoäthanol}$. Diese Inkubation wurde für mindestens 30 Minuten bei 40°C gehalten, darauf erfolgte die Carboxymethylierung.

Die Carboxymethylierung wurde im wesentlichen nach Crestfield et al. (125) durchgeführt: Zu $600\text{ }\mu\text{l}$ der reduzierten und denaturierten Proben wurden $50\text{ }\mu\text{l}$ einer Lösung von 0.268 g Iodessigsäure in $1\text{ ml } 1\text{ N NaOH}$ gegeben, und der pH durch gelegentliche Zugabe von kleinen Mengen 1 N NaOH über 8.0 gehalten. Nach 15 Minuten erfolgte die Citraconylierung.

Dazu wurden $600\text{ }\mu\text{l}$ Aliquote der carboxymethylierten Proben

mit 60 μ l einer Mischung CA/THF = 1:1, Vol/Vol) versetzt. Die Zugabe erfolgte in 10 Portionen innerhalb von ca. 10 Minuten. Der pH-Wert wurde an einer Glaselektrode beobachtet. Er wurde durch Zugabe eines 60 μ l-Aliquots von 1 N NaOH nach jeder 6 μ l-Portion CA/THF über 8.2 gehalten. Danach wurden die Proben weitere 5 Minuten stehengelassen.

Die Citraconylierung erfolgte bei 0°C oder Raumtemperatur. Anschließend erfolgte Dialyse gegen 500 Volumina Maurer-System 1-Elektrophorese-Puffer (52), der 6 M an Harnstoff war. Dialyse bei Raumtemperatur unter Rühren. 5 - 300 μ l der dialysierten Proben wurden dann auf Polyacrylamidgele aufgesetzt.

Gelelektrophorese in Gegenwart von Harnstoff:

Gelabmessung: Zylindrische Gele, 5 x 60 mm. Die Gele enthielten 3.4 bis 10 % Acrylamid, 0.1 bis 0.3 % BIS und 0.023 % TEMED, und waren 6 M an Harnstoff. Das System war Maurer 1 (52), Laufzeiten zwischen 1 und 3 Stunden bei 200 bis 300 V (stabilisiert) und 4°C. Es wurde angefärbt und entfärbt, wie in F 3 b beschrieben.

Der Nachweis der erschöpfenden Citraconylierung erfolgte mit der TNBS-Methode (60), wie in F 4 beschrieben, nachdem Aliquote der Ansätze durch Chromatographie an Sephadex G50 mit 0.02 M K-Phosphat-Puffer, pH 8.5, äquilibriert worden waren. Zum Nachweis der vollständigen Carboxymethylierung wurden Aliquote der Ansätze nach Carboxymethylierung durch Chromatographie an Sephadex G50 in Denaturierungspuffer ohne Thiol von 2-Mercaptoäthanol befreit, danach erfolgte die Bestimmung von Sulfhydryl-Gruppen nach Ellman (49). Zur Gelchromatographie in Denaturierungspuffer wurden Bettvolumina verwendet, die mindestens das 40-fache der Probenvolumina betragen.

11. Zu Kapitel III 1 Lokalisierung der Transferasen

Vor den Beladungen wurde FSS wie folgt behandelt: Eine Lösung von FSS (20 mg/ml) wurde in K-Phosphat-Puffer, 0.1 M, pH 6.5, 10^{-3} M DTNB bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert.

1-¹⁴C-Acetyl-CoA-Beladung:

Eine Probe mit 10 mg/ml DTNB-behandelter FSS wurde dann bei 0° für 8 Minuten mit 10^{-3} M 1-¹⁴C-Acetyl-CoA (spezifische Radioaktivität: 44,1 mCi/mMol) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 Volumina Denaturierungslösung abgestoppt. Denaturierungslösung: 7 M GuHCl, 0.7 M TEA/HCl, 2.5×10^{-3} M DTNB, mit NaOH auf pH 8.2 eingestellt. Die Proben wurden vor der Citraconylierung 15 Minuten bei Raumtemperatur gehalten.

3-¹⁴C-Malonyl-CoA-Beladung:

Das DTNB-behandelte Enzym (20 mg/ml) wurde für 30 Minuten bei 0°C mit 1.1×10^{-4} M 3-¹⁴C-Malonyl-CoA (29 mCi/mMol) inkubiert und denaturiert wie oben beschrieben.

1-¹⁴C-Palmityl-CoA-Beladung:

Das DTNB-behandelte Enzym (13 mg/ml) wurde bei 0°C für 15 Minuten mit 7×10^{-5} M 1-¹⁴C-Palmityl-CoA inkubiert und denaturiert wie oben beschrieben.

Radioaktive Markierung der Untereinheit α :

Die Markierung mit 1-¹⁴C-JAM erfolgte nach Kresze et al. (57). 1-¹⁴C-Carboxyamidomethyl-FSS (9 mg/ml) wurde mit DTNB behandelt und, wie oben beschrieben, denaturiert.

Die Citraconylierung erfolgte mit 600 μ l-Aliquoten der beladenen und denaturierten Proben, wie in F 10 beschrieben, bei 0°C.

Die Reduktion und Carboxymethylierung erfolgte wieder in An-

lehnung an Crestfield (125). Der pH-Wert wurde auf 8.4 gebracht (N NaOH) und dann zu 900 μ l der citraconylierten Proben 8 μ l 2-Mercaptoäthanol gegeben. Nach 30 Minuten bei 40°C erfolgte Zugabe von 75 μ l einer Lösung von 0.268 g Jodessigsäure in 1 ml 1 N NaOH. Während 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde der pH-Wert durch gelegentliche Zugabe von 1 N NaOH über 8.0 gehalten. Es folgten Dialyse und Gelelektrophorese wie in F 10 beschrieben.

Die Gele wurden nach Anfärben und Entfärben geschnitten und die Fraktionen im Szintillationszähler ausgezählt (s. F 3 b).

Die Experimente von Kapitel III 2 wurden durchgeführt wie in F 10 beschrieben.

12. Zu Kapitel IV 1 Präparative Gelelektrophorese

Es kam das Gelsystem Maurer 1 zur Anwendung (5 % an Acrylamid). Die Rohrzuckerlösungen entsprachen in ihrer Ionenzusammensetzung den Acrylamidgelen.

Die Bildung der Rohrzuckergradienten und das Aufpolymerisieren der Trenngele ist bei Weithmann beschrieben (20). In Abänderung dieses Verfahrens wurde jedoch ins untere Ende der LKB-Isofokussiersäule ein 10 %iges Acrylamidgel als elektrophoretisch durchlässiger Stöpsel polymerisiert, auf den der Rohrzuckergradient geschichtet wurde. Dies erlaubte die Verwendung der LKB-Säule als gekühltes Elektrophoreserohr, das man einfach in den Anodenpuffer eintauchen konnte (5 l). Damit war man bezüglich der Puffervolumina nicht mehr auf das kleine Pufferreservoir ($\sim$ 30 ml) der geschlossenen Apparatur beschränkt. Der Kathodenpuffer wurde durch kontinuierliche Umwälzung mit einer Schlauchpumpe ständig mit dem Anodenpuffer ausgetauscht (nach ca. 1-stündiger Elektrophorese, um eine Mischung mit der in Rohrzuckerlösung aufgeschichteten Probe zu vermeiden). Die Laufzeiten be-

trugen bei 150 bis 200 V (stabilisiert) und 3°C etwa 18 bis 30 Stunden. Es wurden zwischen 2 und 5 mg Spaltansatz aufgesetzt.

Zum Fraktionieren der Rohrzuckergradienten wurde nach beendtem Lauf das Obergel mit einem Teflonschlauch vorsichtig durchstoßen, um beim Abzapfen der Rohrzuckerlösung Luftausgleich zu ermöglichen. Dann wurde das untere Stöpselgel mit einer Injektionsnadel durchstoßen, die über einen Schlauch durch eine Pumpe mit einem Fraktionskollektor verbunden war. Es wurde in 1 ml-Fractionen eluiert.

13. Zu Kapitel IV 2 Präparative Rohrzuckergradienten-Zentrifugation

Die Rohrzuckergradienten waren 8 - 25 % oder 10 - 20 % an Rohrzucker Puffer: 0.02 M Tris/HCl, pH 7.5, 1 mM DTT. Von den in obigem Puffer umäquilibrierten Standard-Spaltansätzen wurden 1.5 bis 2.5 mg in 500-bis 700 µl-Volumina aufgetragen. Die Zentrifugationszeiten sind in den Legenden der entsprechenden Abbildungen angegeben. Zentrifugation bei 41 000 UpM (durchschnittlich 230 000 g) in Beckman SW 41 Rotoren bei 2 - 3°C.

Chromatographie an Sepharose 6B:

Die Säule wurde von Herrn Friedrich zur Verfügung gestellt. Sie war 140x1.2 cm. Es wurden ca. 10 mg Standard-Spaltansatz (α -1-¹⁴C-CAM-FSS), der in 50 mM Tris/HCl, pH 8.5, 1 mM DTT, äquilibriert war, aufgetragen. Durchflußgeschwindigkeit ca. 7 ml/Stunde, 4 - 5°C. Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8.5, 1 mM DTT.

14. Zu Kapitel IV 3 b Aminosäureanalyse

Die Analysen von Aminosäuregemischen erfolgte im Aminosäureanalysator (Biotronik) mit angeschlossenen Integrator (System 1, Biotronik). Die Aminosäuregemische wurden auf eine

Kationenaustauschersäule (Durrum DC-4A) gepumpt und mit Li-Citrat-Puffer eluiert (126). Die Aminosäuren wurden mit Ninhydrinreagenz nachgewiesen.

Proteinhydrolysen:

Die HCl-Hydrolysen erfolgten in Anlehnung an Blackburn (127), Hare (128) und Tristram und Smith (129).

Die Proben wurden durch Chromatographie an Sephadex G50 mit 50 mM Ammoniumacetat-Puffer, pH 7.0, äquilibriert und jede Probe auf 4 ausgezogene, dickwandige Reagenzgläser (Pyrex oder Durrum) (19x1.3 cm) verteilt. Nach Lyophilisation bis zur Trockne wurde jeweils 1 ml 6 N HCl (konstant siedende HCl) mit 0.1 % (V/V) 2-Mercaptoäthanol und 0.1 % (G/V) Phenol zugesetzt. Die Reagenzgläser wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, im Ölpumpenvakuum unter langsamen Auftauen evakuiert und nach Wiederholung dieses Vorgangs zugeschmolzen. Die Hydrolyse fand bei 106°C statt. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurde jeweils ein Glas einer Probe geöffnet und sofort am Rotationsverdampfer (Badtemperatur: 40°C) getrocknet. Der Rückstand wurde in ca. 3 ml dest. H₂O aufgenommen und erneut getrocknet. Nach Wiederholung dieses Schrittes wurde der Rückstand in einem definierten Volumen Probenverdünnungspuffer aufgenommen (126) und zur Entfernung unlöslicher Bestandteile zentrifugiert (5 Minuten bei 10 000 g, Hettich Mikroliter-Zentrifuge).

Zur Bestimmung von Proteinthiolen nach Ellman (49) wurden die Proben durch Gelfiltration an Sephadex G50 mit 0.1 M K-Phosphat-Puffer, pH 7.0, 6 M Harnstoff äquilibriert.

Die Bestimmung von Tryptophan erfolgte nach Goodwin und Morton (88). Dazu wurden die Proben durch Filtration an Sephadex G50 mit 0.1 N NaOH äquilibriert. Die Tyrosin-Referenzwerte wurden aus der Analyse der Aminosäurezusammensetzung erhalten.

15. Zu Kapitel IV 5 Aggregationsverhalten

Die Reaktivierungsansätze (1-3 mg/ml) wurden auf Rohrzuckergradienten in SW 41-Rotoren bei 41 000 UpM und 2 - 3^o für 8 Stunden zentrifugiert. Die Becher enthielten 1.5 ml einer 50 %igen Rohrzuckerlösung und darauf einen Gradienten von 8 - 25 % Rohrzucker. Puffer: 0.1 M K-Phosphat, pH 7.5, 10 mM DTT, 0.5 mM K-EDTA.

16. Zu Kapitel V Kaninchenantikörper

Immunisierschema.

Die Proteinproben lagen in 20 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7.5, vor. Zur Immunisierung wurden sie 1:1 mit komplettem Freund'schen Adjuvans versetzt und in einem Ultraschallbad gründlich gemischt. Die Kaninchen stammten aus einer Eigenzucht unseres Instituts.

1. Tag	150 µg	je Probe und Tier	mit komplettem Adjuvans
8. "	50 "	" " " "	ohne " "
15. "	50 "	" " " "	mit " "
31. "	50 "	" " " "	ohne " "
46. "	50 "	" " " "	mit " "
71. "	50 "	" " " "	Titerbestimmung

Danach erfolgte 3-wöchentlich Nachimpfung der Tiere mit ca. 50 µg jeder Probe und komplettem Adjuvans bei jeder zweiten Injektion. Alle Injektionen erfolgten subcutan. In Mindestabständen von vier Wochen konnten den Tieren bis zu 40 ml Blut durch einen Schnitt in die äußere Ohrvene abgenommen werden.

17. Zu Kapitel V 1 Spezifität der Antikörper

a. Ouchterlony-Diffusion

Zu 100 ml eines Tris/HCl-Puffers, pH 7.5, 0.02 M, 0.1 M NaCl

wurden 0.6 g Agar-Agar (Difco) gegeben und die Mischung im Wasserbad auf 70° erhitzt, bis die Agarose in Lösung gegangen war. 11 ml dieser heißen Lösung wurden auf Kunststoff-Petrischalen (Durchmesser 8.8 cm) pipettiert und bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Erstarren der Agarose wurden Löcher mit 8 mm Durchmesser mit einem Randabstand von 4 mm gestanzt. In diese Löcher wurden 50 - 70 µl der Seren, Immunglobuline und Antigene pipettiert. Die Diffusion fand während 24 - 48 Stunden bei Raumtemperatur in einer geschlossenen, feuchten Kammer statt.

b. Isolierung der IgG (130)

Die Seren wurden mit $\frac{1}{50}$ ihres Volumens an K-Phosphat-Puffer 1 M pH 7.5 versetzt und auf 40 % der Sättigung an Ammoniumsulfat gebracht. Nach Zentrifugation wurden die Niederschläge mit 40 %iger Ammoniumsulfatlösung in 0.02 M K-Phosphat, pH 7.5, gewaschen und gegen 0.02 M K-Phosphat, pH 7.5, bei 4° über Nacht dialysiert. Die Dialysate wurden an Whatman DE 52 Anionenaustauscher chromatographiert. Puffer: 20 mM K-Phosphat pH 7.5, Elution unter Startbedingungen. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden gesammelt und auf 40 % der Sättigung an Ammoniumsulfat gebracht. Nach Zentrifugation wurden die Niederschläge in 20 mM Tris/HCl pH 7.5 aufgenommen und entweder durch Gelchromatographie an Sephadex G50 im gleichen Puffer oder durch Dialyse entsalzt. Solche IgG-Fraktionen zeigten auf der SDS-Gelelektrophorese unter reduktiven Bedingungen zwei Banden.

c. Aufnahme der Immuno-Präzipitationskurven

Konstante Mengen von α -¹⁴C-CAM-FSS-Standardspaltansätzen wurden mit steigenden Mengen des jeweiligen Serums oder IgG versetzt, wobei die Endvolumina konstant gehalten wurden. Nach 1-stündiger Inkubation bei 25°C wurden die Ansätze zentrifugiert (2 x 2 Min., 10 000g) und Aliquote der Überstände in den Acetyltransferase-Test und zur Radioaktivitätsbestimmung eingesetzt. Als 100 %-Wert diente die spezifische

Radioaktivität und Acetyltransferase-Aktivität des α - ^{14}C -CAM-Spaltansatzes.

18. Zu Kapitel V 2 Hemmversuche

Die Messung der Teilaktivitäten und Inkubation nativer FSS mit den jeweiligen Antikörpern erfolgte am Präzipitationspunkt. (FSS/Anti- β -IgG = 1:20 , FSS/Anti- α -IgG = 1:80). Dazu wurde natives Enzym mit den Antikörpern in einem Endvolumen von 100 oder 200 μl 30 Min. bei Raumtemperatur vorinkubiert und anschließend ein Aliquot dieser Inkubation in die Aktivitätstests eingesetzt. Die Durchführung der Tests ist in F a, c - f beschrieben. Wegen der zu hohen Grundextinktionen bei 233 nm konnte die Malonyltransferase hier nicht optisch bestimmt werden. Es wurde der radioaktive Test von Weithmann verwendet (20), wobei in jedem Test 35 000 IpM an 3- ^{14}C -Malonyl-CoA eingesetzt wurden. Der 100 %-Umsatz bei 1.8 μg nativer FSS und 3-minütiger Inkubation betrug 12 300 IpM, der Blindwert 1.7 % davon.

19. Zu Kapitel VI 1 Anreicherung von FSS-IgG-FSS-Komplexen

Zur Anreicherung IgG-verbrückter FSS wurde natives Enzym in 0.1 M K-Phosphat pH 7.5 mit jeweils etwa einem Fünftel der Menge an Antikörper versetzt, die zur quantitativen Präzipitation des Komplexes führt. Anschließend wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur und eine weitere Stunde im Eisbad stehen gelassen. Gelegentlich auftretende Trübungen wurden abzentrifugiert (10 000 g x 10 Min.). Darauf wurden die Ansätze (3 - 12 mg Gesamtprotein) auf folgende Gradienten aufgetragen: 0.1 M K-Phosphat pH 7.5, 10 - 40 % Rohrzucker, und im Rotor SW27 (Beckman) 15 Stunden bei 25 000 UpM zentrifugiert (3-4°C). Nach beendetem Lauf wurden die Becher unten angestochen und die Gradienten in ~ 0.8 ml Fraktionen eluiert.

20. Zu Kapitel VI 2 Präparation der Proben für die Elektronenmikroskopie

Proben aus den Rohrzuckergradienten und natives Enzym wurden mit folgenden Puffern auf eine Proteinkonzentration von 0.03 bis 0.1 mg/ml verdünnt: 0.1 M K-Phosphat pH 7.0 oder 7.5, 1 mM DTT, 0.5 M K-EDTA, 0.1 mg Rinderserumalbumin/ml, 20 % Rohrzucker. Diese Bedingungen ergaben eine befriedigende Benetzung der Netze. Die Netze waren in Vakuum im Lichtbogen von Kohleelektroden durch Bedampfung mit einer Kohlefolie belegt worden. Diese Folie war mit Äthanol bedampft worden.

Die Netze wurden für 30 Sek. oder 1 Min. mit ihrer bedampften Seite auf ein 20 µl-Tröpfchen der verdünnten Proteinproben gelegt. Anschließend erfolgte die Anfärbung mit Phosphorwolframsäure: Eine 1 %ige oder 2 %ige Lösung von Phosphorwolframsäure wurde mit 2 N KOH auf pH 7.0 oder 7.5 gebracht. Die Netze wurden unmittelbar nach der Benetzung mit der Probe mit ihrer Kohle-Seite auf 50 µl-Tropfen der Färbelösung gelegt. Wiederum nach 30 Sek. oder 1 Min. wurden sie vom Tropfen gehoben und mit dünnem Seidenpapier am Rand vorsichtig überschüssige Flüssigkeit abgesaugt. Nach einer Trockenzeit von 10 - 15 Min. (Raumtemperatur) konnten solche Proben zur Elektronenmikroskopie eingesetzt werden. (Elektronenmikroskop Siemens 1).

21. Zu Kapitel VII Versuche zur Isolierung von "Teilkomplexen"

FSS und α -1-¹⁴C-CAM-FSS (57) wurden DMMA-Standard-Spaltbedingungen ausgesetzt, jedoch nur für 130 oder 140 Sek. Anschließend wurde mit einem Zehntel des Volumens 2 M Lysinhydrochloridlösung, die mit NaOH auf pH 8.0 eingestellt war, abgestoppt. Die Ansätze wurden an Sephadex G50 in 20 mM K-Phosphat, pH 8.5, 10 mM 2-Mercaptoäthanol äquilibriert und anschließend auf Rohrzuckergradienten auf-

getragen. Gradienten: 20 mM K-Phosphat, pH 8.5, 10 mM 2-Mercaptoäthanol, 6 - 30 % Rohrzucker. Solche Gradienten wurden entweder in einem Christ 70 Festwinkelrotor bei 70 000 UpM (3-4°C) 100 Min. in einer Christ Omega Zentrifuge oder in SW41 Rotoren für 15 Stunden zentrifugiert. SW41-Gradienten enthielten am Boden 1,5 ml einer 50 %igen Rohrzuckerlösung des gleichen Puffers. Nach beendetem Lauf wurden die Becher am Boden angestochen und die Gradienten in ~0,5 ml Fraktionen eluiert.

Zusammenfassung

Bei Untersuchungen zur Struktur des Multienzymkomplexes FSS aus Hefe wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Der Komplex ist durch chemische Modifizierung von Lysin-Seitenketten mit DMMA vollständig und reversibel dissoziierbar. Die beiden Aktivitäten der β -Ketoacylsynthetase und β -Ketoacylreduktase sind abhängig von einer höheren Aggregation der Untereinheiten. Die Reaktivierung ausschließlich zu einer Proteinspezies, die identisch mit nativer FSS im Schwerfeld der analytischen Ultrazentrifuge und in der "nativen" Gelelektrophorese wandert, zeigt, daß die komplette 40 S-Struktur des Komplexes unter den angewendeten Bedingungen thermodynamisch am stabilsten ist. Der reaktivierte Komplex zeigt noch 50 % seiner ursprünglichen Gesamtaktivität. Für die Geschwindigkeit und die Ausbeute der Reaktivierung stellt sich die kondensierende Teilaktivität als limitierend heraus.
2. Die Untereinheiten des Komplexes wurden im präparativen Maßstab isoliert. Proteinchemische Beladungsexperimente und Messung von Teilenzym-Aktivitäten bestätigen die Lokalisierung von vier Teilaktivitäten auf Grund genetischer Experimente und lokalisieren darüber hinaus die Acetyltransferase als ein Teilenzym der β -Untereinheit. Damit ist der proteinchemische Beweis erbracht, daß die β -Untereinheit ein multifunktionelles Polypeptid ist, welches fünf enzymatische Teilaktivitäten zu katalysieren vermag.
Die Untereinheiten wurden weiter proteinchemisch charakterisiert.
3. Es wurden spezifische Kaninchen-Antikörper gegen die beiden Untereinheiten erhalten und näher charakterisiert. Diese Antikörper dienten einer topographischen Untersuchung der Komplexstruktur im Elektronenmikroskop.

Mit den hieraus erhaltenen Daten wurde ein von Lynen vorgeschlagenes dreidimensionales Modell der FSS aus Hefe bezüglich der Verteilung ihrer Untereinheiten im Komplex erweitert.

4. Ein Gelelektrophoresesystem für denaturierte Polypeptide basierend auf chemischer Derivatisierung von Proteinproben wurde entwickelt und auf verschiedene Proteine angewendet. Das System erscheint als sinnvolle Ergänzung zur SDS-Gelelektrophorese, besonders bei Proteinproben mit ähnlichem Molekulargewicht.
5. Durch chemische Methoden wurde eine Konformationsänderung des Komplexes nachgewiesen, die durch die Beladung der sogenannten peripheren SH-Gruppe mit JAM ausgelöst wird.

Erste Versuche zur Isolierung von kleineren Aggregaten mit Molekulargewichten zwischen dem der Untereinheiten und dem des Komplexes deuten einen Weg an, weiteren Einblick in den Aufbau der FSS zu erhalten.

LITERATURVERZEICHNIS

1. BRODA, E. (1971) in: Biochemical Evolution and the Origin of Life, ed. E. Schoeffeniels, North-Holland Publishing Company, p. 224-235
2. DeDUVE, C. (1959) in: Subcellular Particles, ed. T. Hayashi, Ronald Press, New York
3. LYNEN, F. (1961) Federation Proc. 20, 941-951
4. PIRSON, W., und LYNEN, F. (1971) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 352, 797-804
5. LYNEN, F. (1962) Proc. R.A. Welch Found. Conf. on Chem. Res. No. 5, Houston, Texas, S. 293-328
6. KNOBLING, A., SCHIFFMANN, D., SICKINGER, H.-D., and Schweizer, E. (1975) Eur. J. Biochem. 56, 359-367
7. ELOVSON, I. (1975) J. Bact. 124, 524-533
8. BURTON, D.N., HAAVIK, A.G., and PORTER, J.W. (1968), Arch. Biochem. Biophys. 126, 864-872
9. BRESSLER, R., and WAKIL, S.J. (1961) J. Biol. Chem. 236, 1643-1651
10. STUMPF, P.K. (1969) Ann. Rev. Biochem. 38, 159-212
11. PRESCOTT, D.J. and VAGELOS, P.R. (1972) Adv. Enzymol. 36, 269-311
12. LYNEN, F. (1962) in: Redoxfunktionen cytoplasmatischer Strukturen. Gem. Tagung der Dt. Ges. f. physiol. Chem. und der Österr. Biochem. Ges. Wien, S. 121-143

13. ARNSTADT, K.-J., SCHINDLBECK, G., und LYNEN, F.
(1975) Eur. J. Biochem. 55, 561-571
14. LYNEN, F. (1959) J. Cell. Comp. Physiol. 54,
Suppl. 1, 33-49
15. SCHWEIZER, E., DIETLEIN, G., GIMMLER, G., KNOBLING,
A., TAHEDL, H.W., SCHWIETZ, H. and SCHWEIZER, M.
(1975) Proceedings of the Tenth FEBS-Meeting, p. 85-97
16. SUMPER, M., OESTERHELT, D., RIEPERTINGER, C. und
LYNEN, F. (1969) Eur. J. Biochem. 10, 377-387
17. HAGEN, A., 1963, Dissertation, Universität München
18. WILLECKE, K., 1968, Dissertation, Universität München
19. SUMPER, M., 1970, Dissertation, Universität München
20. WEITHMANN, K.U., 1974, Dissertation, Universität
München
21. SUMPER, M., RIEPERTINGER, D. and LYNEN, F. (1969)
FEBS Lett. 5, 45-49
22. SCHWEIZER, E., KNIEP, B., CASTORPH, H., and HOLZNER,
U. (1973) Eur. J. Biochem. 39, 353-362
23. CRAWFORD, I.P. and YANOFSKY, C. (1958) Proc. Natl.
Acad. Sci. U.S. 44, 1161-1170
24. DeMOSS, I.A. (1965) Biochem. Biophys. Res. Comm. 18,
850-857
25. GUCHHEIT, R.B., POLAKIS, S.E., DIMROTH, P., STOLL, E.,
MOSS, J. and LANE, M.D. (1974) J. Biol. Chem. 249,
6633-6645

26. SPIESS, J., 1976, Dissertation, Universität München
27. LUMSDEN, J. and COGGINS, J.R. (1977) Biochem. J. 161, 599-607
28. YOURNO, J., KOHNO, T. and ROTH, J.R. (1970) Nature 228, 820-824
29. SCHWEIZER, E. (1977) Naturwissenschaften 64, 366-370
30. REED, L.J. (1974) Acc. Chem. Res. 7, 40-46
31. BARRERA, C.R., NAMIHIRA, G., HAMILTON, L., MUNK, P., ELEY, M.H., LINN, T.C. and REED, L.J. (1972) Arch. Biochim. Biophys. 148, 343-358
32. REISLER, E., POUYET, J. and EISENBERG, H. (1970) Biochem. 9, No. 15, 3095-3102
33. JERCHEL, D. and BECKER, H. (1956) Z. f. Naturf. 11b, 681-686
34. WEBER, K., KUTER, D. (1971) J. Biol. Chem. 246, 4504-4509
35. LENARD, L. (1971) Bioch. Biophys. Res. Commun. 45, 662-668
36. MOSS, B. and ROSENBLUM, E. (1972) J. Biol. Chem. 247, 5194-5198
37. Sci. Tools (1968) 15, No. 1
38. VALMET, E. (1969) Sci. Tools 16, 8-13
39. RADOLA, B.J. (1973) Biochim. Biophys. Act. 295, 412-428

40. Manual zu "Activated Thiol-Sepharose 4B", Pharmacia
fine Chemicals AB
41. MURAYAMA, A., RAFFIN, J.P., REMY, P. and EBEL, J.P.
(1975) FEBS Lett. 53, 23-25
42. SCHWEIZER, E., pers. Mitteilung, Kopenhagen, Aug. 1977
43. LORNITZO, A.F., QUERESHI, A.A. and PORTER, J.W. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 4520-4529
44. QUERESHI, A.A., LORNITZO, F.A., JENIK, R.A. and
PORTER, J.W. (1976) Arch. Biochem. Biophys. 177,
364-378
45. GIBBONS, J. and PERHAM, R.N. (1970) Biochem. J. 116,
843-849
46. KLAPPER, M.H. and KLOTZ, J.M. (1972) in: Meth. Enzym.
V. XXV, B, p. 531-536
47. DIXON, H.B.F. and PERHAM, R.N. (1968) Biochem. J.
109, 312-314
48. BUTLER, P.J.G., HARRIS, I.J., HARTLEY, B.S. and
LEBERMANN, R. (1969) Biochem. J. 112, 679-689
49. ELLMAN, G.L. (1959) Arch. Biochem. Biophys. 82,
70-77
50. RILEY, M. and PERHAM, R.N. (1970) Biochem. J. 118,
733-739
51. BRUCE, T.C. and BAKOVIC, S.J. (1966) in: Bio-organic
Mechanisms, Vol. 1, p. 174. New York: W.A. Benjamin
Inc.

52. MAURER, H.R. (1968) Disk-Elektrophorese, Walter de Gruyter u. Co., Berlin
53. SIA, C.L. and HORECKER, B.L. (1968) Biochem. Biophys. Res. Comm. 31, 731-737
54. VAN HOLDE, K.E. (1975) in: The Proteins, 3rd Ed., Vol. 1, 225-291, Academic Press Inc., New York, San Francisco, London
55. SCHACHMANN, H.K. (1959) in: Ultracentrifugation in Biochemistry, Academic Press, New York and London
56. KRESZE, G.-B., 1976, Dissertation, Universität München
57. OESTERHELT, D., BAUER, H., KRESZE, G.-B. and LYNEN, F. (1977) Eur. J. Biochem. 79, 173-180
58. KRESZE, G.-B., STEBER, L., OESTERHELT, D. and LYNEN, F. (1977) Eur. J. Biochem. 79, 181-190
59. KRESZE, G.-B., OESTERHELT, D., LYNEN, F., CASTORPH, H. and SCHWEIZER, E. (1976) Biochem. Biophys. Res. Comm. 69, 893-899
60. HABEEB, A.F.S.A. (1966) Anal. Biochem. 14, 328-336
61. SCHWIETZ, H., DIETLEIN, G., SCHILTZ, E., and SCHWEIZER, E. (1976) Biochim. Biophys. Act. 453, 453-458
62. PUIGSERVER, A. and DESNUELLE, P. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 2442-2445
63. WARBURG, O. and CHRISTIAN, W. (1938) Biochem. Z. 298, 368-377

64. VOGEL, G., pers. Mitteilung
65. RAYMOND, S., and NAKAMICHI, M. (1964) Anal. Biochem. 7, 225-231
66. BLOCH, K. (1977) Ann. Rev. Biochem. 46, 263-289
67. KATIYAR, S. and PORTER, J.W. (1977) Life Sciences 20, 737-760
68. KIRSCHNER, K. and BISSWANGER, H. (1976) Ann. Rev. Biochem. 45, 143-166
69. SHAPIRO, A.L., VINUELA, E. and MAIZEL, J.V., Jr. (1967) Biochem. Biophys. Res. Comm. 28, 815-820
70. WEBER, K. and OSBORN, M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406-4412
71. ENGESER, H., WIELAND, F. and LYNEN, F. (1977) FEBS Lett. 82, 139-142
72. ZIEGENHORN, J., 1970, Dissertation, Universität München
73. ZIEGENHORN, J., NIEDERMEIER, R., NÜSSLER, C. and LYNEN, F. (1972) Eur. J. Biochem. 30, 285-300
74. SCHWEIZER, E., 1963, Dissertation, Universität München
75. SCHWEIZER, E., PICCININI, F., DUBA, C., GÜNTHER, S., RITTER, E. and LYNEN, F. (1970) Eur. J. Biochem. 15, 483-499
76. SCHRECKENBACH, Th., WOBSE, H. and LYNEN, F. (1977) Eur. J. Biochem. 80, 13-23

77. AYLING, J., PIRSON, R. and LYNEN, F. (1972)
Biochemistry 11, 526-532
78. ENGESER, H., 1978, Dissertation, Universität München
79. ENGESER, H., HIRSCH, A. and LYNEN, F. (1976)
10th Int. Congr. Biochem., Hamburg, Abstract
O4-3-333
80. LAEMMLI, U.K. (1970) Nature 227, 680-685
81. FUJIKI, H. and ZUREK, G. (1975) FEBS Lett. 55,
242-244
82. FRIEDRICH, J., 1978, Dissertation, Universität München
83. FIETZEK, P.P. and KÜHN, K. (1976) in: International
Review of Connective Tissue Research (Hall, D.A.
and Jackson, D.S., eds.) Vol. 7, pp. 1-60, Academic
Press, New York
84. HENSCHEN, A. (1977) pers. Mitteilung
85. KRESZE, G.-B., pers. Mitteilung
86. Atlas of Protein Sequence and Structure (Dayhoff,
M.D., ed.) (1976) Vol. 5, Suppl. 2, pp. 198-204
The National Biomedical Research Foundation,
Washington
87. MARTIN, R.G. and AMES, B.N. (1961) J. Biol. Chem. 236,
1372-1379
88. GOODWIN, T.W. and MORTON, R.A. (1946) Biochem. J. 40,
628-632

89. OESTERHELT, D., BAUER, H. and LYNEN, F. (1969)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 1377-1382
90. OESTERHELT, D., pers. Mitteilung
91. KOLB, H.J. (1977), pers. Mitteilung
92. HESS, S., 1976, Dissertation, Universität München
93. QUERESHI, A.A., LORNITZO, F.A., HSU, R.Y. and
PORTER, J.W. (1976) Arch. Biochem. Biophys. 177,
379-393
94. OUCHTERLONY, Ö. (1949) Arkiv Kemi 26B, No. 14, 1-9
95. HESS, S., pers. Mitteilung
96. STOLLAR, D. and LEVINE, L. (1963) Meth. Enzym. 6,
848-854
97. TISCHENDORF, G.W., ZEICHHARDT, H. and STÖFFLER, G.
(1974) Molec. Gen. Genet. 134, 187-208
98. TISCHENDORF, G.W., ZEICHHARDT, H. and STÖFFLER, G.
(1974) Molec. Gen. Genet. 134, 209-223
99. HOFSCHNEIDER, P.H. and HAGEN, A. (1964) Third
European Regional Conf. Elect. Microscopy, Publ.
House, Czechos. Ac.Sci., Prague, 69-70
100. STERNBERGER, L.A. (1973) in: Electron Microscopy
of Enzymes. Principles and Methods, Vol. 1,
S. 150-191, Van Nostrand Reinhold Company
101. LYNEN, F. (1976) Jahrestagung, Ges. Biol. Chem.,
München

102. FOX, J.L. (1978), Veröffentlichung in Vorbereitung
103. SCHWEIZER, E., WILLECKE, K., WINNEWISSER, W. and
LYNEN, F. (1970) Vitam. Horm. 28, 329
104. PILZ, L., HERBST, M., KRATKY, O., OESTERHELT, D.
and LYNEN, F. (1970) Eur. J. Biochem. 13, 55-64
105. HOPPE, W., SCHRAMM, H.J., STURM, M., HUNSMANN, N.
and GASSMANN, J. (1976) Z. Naturforsch. 31a, 1380-1390
106. WETLAUFER, D.B. (1973) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70,
697-701
107. Sorvall Instr. Manual for Ultravertical-Rotors
(1976) Dupont Comp.
108. SIMON, E.J. and SHEMIN, D. (1953) J. Am. Chem. Soc.
75, 2520
109. LYNEN, F. (1951) Justus Liebigs Ann. Chem. 574,
33-37
110. EGGERER, H. und LYNEN, F. (1962) Biochem. Z. 335,
540-547
111. WIELAND, T. und RUEFF, L. (1953) Angew. Chemie 65,
186-187
112. MAJERUS, P.W., ALBERTS, A.W. and VAGELOS, P.R.
(1969) Meth. Enzym. XIV, 43-56
113. PIRSON, W., 1970, Dissertation, Universität München
114. CUATRECASAS, P. (1972) Adv. Enzym. 36, 29-89
115. KUNITZ, M., SIMMS, H.G. (1928) J. gen. Physiol. 11,
641

116. BEISENHERZ, G., BOLTZE, H.J., BÜCHER, Th., CZOD, R.,
GARBADE, K.H., MEYER-AHRENDT, E. und PFLEIDERER, G.
(1953) Z. für Naturf. 86, 555-577
117. SUMPER, M., OESTERHELT, D., RIEPERTINGER, C.,
LYNEN, F. (1969) Eur. J. Biochem. 10, 377-387
118. WARBURG, O. und CHRISTIAN, W. (1942) Biochem. Z. 310,
384-421
119. BUCKEL, W. und EGGERER, H. (1965) Biochem. Z. 343,
29-43
120. LYNEN, F. (1962) in: Meth. Enzym. V, 443-451
121. SCHRECKENBACH, Th., 1975, Dissertation, Universität
München
122. biochemica-Dienst No. 29 (1975), Fa. Boehringer
Mannheim
123. SCHMITT, Th., 1977, Diplomarbeit, Universität München
124. SEUBERT, W. (1962) in: Methoden der enzymatischen
Analyse, H.U. Bergmeyer (Hrsgb.), Verlag Chemie,
Weinheim, S. 433
125. CRESTFIELD, A.M., MOORE, S. and STEIN, W.H. (1963)
J. Biol. Chem. 238, 622-627
126. Handbuch der Aminosäureanalyse (1974) Fa. Biotronik,
München
127. BLACKBURN, S. (1968) in: Amino Acid Determination,
Marcel Dekker Inc., New York

128. HARE, P.E. (1975) in: Protein Sequence Determination, 2nd Ed., S. 204, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
129. TRISTRAM, G.R. and SMITH, R.H. (1963) Adv. Prot. Chem. 18, 227-318
130. WILLIAMS, C.A. and CHASE, M.W. (eds.) (1967) in: Methods in Immunology and Immunochemistry 1, 321-332. Acad. Press, New York and London
131. GLAZER, A.N., DELANGE, R.J. and SIGMAN, D.S. (1976) in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 4, pp. 68-121
132. MÜLLER, P. (1977), pers. Mitteilung

Lebenslauf

Ich wurde am 23. März 1948 in München geboren. Meine Eltern sind der Mediziner Professor Dr.med. Otto Wieland und seine Frau Rosemarie, geborene Quilling.

1954 - 1958	Grundschule in München
1958 - 1961	Wittelsbacher Gymnasium in München
1961	Umzug nach Starnberg
1961 - 1967	Realgymnasium in Starnberg
Juli 1967	Abitur
Oktober 1967	Beginn des Chemiestudiums an der Universität München
März 1971	Diplom-Vorprüfung
Dezember 1973	Diplom-Hauptprüfung
Januar 1974 - Oktober 1977	Anfertigung der Diplom- und Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der Anleitung von Professor Dr. F. Lynen.

Seit 1969 bin ich mit Annette Purrmann verheiratet. Wir haben zwei Söhne.

